Analytische Untersuchungen über die primären Prostaglandine $F_{2\alpha}$ und E_2 und ihre 13,14-dihydro-15-keto-Metaboliten im reproduktiven Zyklus des Rindes

GERHARD ENZENHÖFER

Diss
München
1979

Aus dem Institut für Physiologie
der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weihenstephan
der Technischen Universität München
Direktor : Prof. Dr. Heinrich Karg

vorgelegt über das Institut für Physiologie
Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität München

Analytische Untersuchungen über die primären Prostaglandine $F_{2\alpha}$ und E_2 und ihre 13,14-dihydro-15-keto-Metaboliten im reproduktiven Zyklus des Rindes

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
G e r h a r d E n z e n h ö f e r
aus
Eysölden (Mittelfranken)

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan : Prof. Dr. W.Leidl

Referent : Prof. Dr. U.Lösch

Korreferent : Prof. Dr. K.Walser

Tag der Promotion : 27.Juli 1984

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I,	Einleitung	1
IA,	Chemische Eigenschaften	2
IB,	Biosynthese	8
IC,	Metabolismus	11
ID,	Pharmakologie	14
II,	Aufgabenstellung	16
III,	Experimentelles	17
IIIA,	Materialien	17
IIIA1,	Chemikalien,Biochemica	17
IIIA2,	Geräte,spezielle Materialien	17
IIIA3,	Lösungsmittel,Puffer	19
IIIB,	Analytische Methoden	21
IIIB1,	Vorreinigung von Plasmaproben	21
IIIB2,	Radioimmuntest	23
IIIB2a,	Nach Vorreinigung	23
IIIB2b,	Ohne Vorreinigung (Direkttest)	30
IIIB3,	Kalibrierung der Eichkurven	32
IIIB4,	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	33
IIIB4a,	Methanolelution	33
IIIB4b,	Acetonitrilelution	35
IIIC,	Antikörperproduktion	36
IIIC1,	Antigensynthesen	36
IIIC2,	Immunisierung	40
IIIC3,	Gewinnung und Charakterisierung der Antikörper	41
IIID,	Validität der Prostaglandinbestimmungen	46
IIID1,	"In vitro" Metabolismus	46
IIID2,	Präzision und Nachweisgrenzen des Radioimmuntests	49
IIID3,	Reproduzierbarkeit	53
IIID4,	Spezifität der Messungen	54

		Seite
IIIE,	Weitere hormonanalytische Verfahren	57
IIIF,	Tierexperimente	58
IIIF1,	Operation,Probengewinnung,-behandlung,-lagerung	58
IIIF2,	Halbwertszeitversuche	60
IIIF3,	Prostaglandinfreisetzung im physiologischen Zyklus	61
IIIF4,	Behandlung von Kalbinnen mit Ocytocinantikörpern	62
IIIF5,	Ocytocininjektionen bei Kalbinnen	63
IV,	Ergebnisse der Versuche am Rind	63
IVA,	Prostaglandinhalbwertszeitbestimmungen	63
IVB,	Prostaglandinfreisetzung im physiologischen Zyklus	72
IVC,	Auswirkungen der Behandlung von Kalbinnen mit Ocytocinantikörpern	80
IVD,	Auswirkungen von Ocytocininjektionen	87
V,	Diskussion	90
VA,	Methoden	90
VB,	Tierexperimente	93
VI,	Zusammenfassung	99
VII,	Literaturverzeichnis	104
VIII,	Tabellenanhang	115
Lebenslauf		132

Abkürzungen

Folgende Trivialnamen und Abkürzungen wurden gebraucht:

Aspirin	Acetylsalicylsäure
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
EDTA	Titriplex III
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
PGA_2	Prostaglandin A_2
PGAM	13,14-dihydro-15-keto-Prostaglandin A_2
PGB_2	Prostaglandin B_2
PGE_2	Prostaglandin E_2
PGEM	13,14-dihydro-15-keto-Prostaglandin E_2
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandin $F_{2\alpha}$
PGFM	13,14-dihydro-15-keto-Prostaglandin $F_{2\alpha}$
PGG_2	Prostaglandin G_2
PGH_2	Prostaglandin H_2
PGI_2	Prostacyclin
pK_a	Der pH-Wert,an dem die dissoziierte und nicht dissoziierte Form einer Substanz in gleicher Konzentration vorliegen
p.p.	post partum
RIA	Radioimmuntest (Radioimmunoassay)
TxA_2	Thromboxan A_2

I,Einleitung

Die Prostaglandinforschung erfuhr in den letzten 15 Jahren eine stürmische Entwicklung.Dabei weiß man schon seit langem von charakteristischen Prostaglandinwirkungen.
So wurde z.B. in China im Mittelalter Samenflüssigkeit junger Männer zur Therapie von Magengeschwüren herangezogen (Rao 1975),und die Medizinmänner bestimmter zentralafrikanischer Stämme sollen mit solchen Prostaglandinzubereitungen Wehen ausgelöst haben (Harley 1970).
Die Entdeckung der Prostaglandine als chemische Substanzklasse fand jedoch erst im 20. Jahrhundert statt.
Goldblatt beschrieb schon 1933 die blutdrucksenkende,die Uterus- und Dünndarmmuskulatur kontrahierende und die Thrombozytenaggregation stimulierende Wirkung von Extrakten aus Samenflüssigkeit.
Doch erst dem schwedischen Pharmakologen von Euler blieb es 1935 vorbehalten,die wirksame Substanz aus Prostata- und Samenextrakten als ungesättigte Fettsäuren zu charakterisieren.Er definierte auch die neue Substanzklasse als "Prostaglandine".
Die endgültige Identifizierung und Isolierung der Prostaglandine gelang Bergström et al. 1968.
Durch die Entdeckung von Prostaglandinisomeren in der karibischen Korallenart Plexaura homomalla durch Weinheimer und Spraggins (1969),die chemisch zu den bei Säugetieren vorkommenden Prostaglandinen umgewandelt werden können,und die Entwicklung von Methoden zur chemischen Totalsynthese durch Corey (1971) standen endlich ausreichende Mengen an Untersuchungsgut zur Verfügung,um die Prostaglandinforschung in großem Umfang betreiben zu können.
Der Erkenntnisstand über Wirkungsweise und physiologische Bedeutung der Prostaglandine stieg daraufhin in den siebziger Jahren sehr rasch.
So wurde die Prostaglandinbiosynthese,ausgehend von essentiellen Fettsäuren der Linolsäuregruppe über die

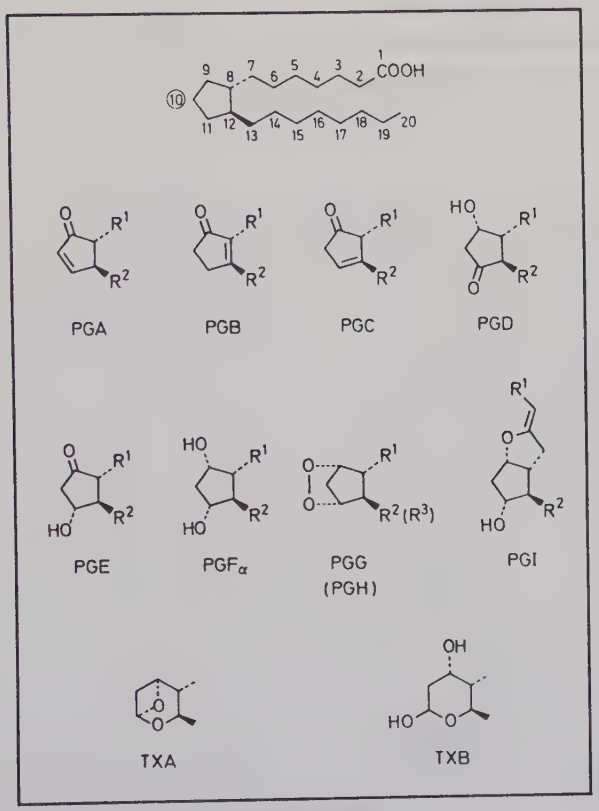
Arachidonsäure zu den Prostaglandinendoperoxiden PGG_2 und PGH_2 und schließlich zu den primären Prostaglandinen, z.B. $PGF_{2\alpha}$ und PGE_2,sowie deren Metabolismus geklärt. Auch die Entdeckung neuer Prostaglandingruppen,wie der eben genannten Endoperoxide,der Prostazykline,der Thromboxane und der Leukotriene gelang während dieser Phase. Eine endgültige Klärung des physiologischen Zusammenspiels und der Aufgabenverteilung der einzelnen Prostaglandine, insbesondere im Zusammenhang mit den Reproduktionsvorgängen,ist jedoch noch nicht in Sicht.

A,Chemische Eigenschaften

Bei den Prostaglandinen handelt es sich um eine Gruppe ungesättigter Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen,die sich strukturell von der Prostansäure ableiten.
Das Prostaglandinmolekül setzt sich aus drei Bestandteilen zusammen,einem Cyclopentanring,an dem zwei Seitenketten ansetzen.
Dabei besteht die untere Seitenkette aus acht,die obere,deren erstes Glied eine Carboxylgruppe darstellt, aus sieben Kohlenstoffatomen.
Die Numerierung beginnt an der Carboxylgruppe mit C 1 , läuft um den Fünfring herum (C 8 bis C 12) und endet am letzten C-Atom der unteren Seitenkette mit C 20.
Charakteristische Strukturmerkmale der natürlich vorkommenden primären Prostaglandine D,E,F sind jeweils zwei Sauerstoffunktionen im Cyclopentanring in Position 9 und 11 ,eine trans-Doppelbindung zwischen C 13 und C 14,sowie eine Hydroxylgruppe in -15α Position (Riefling 1983).
Die Zuordnung eines Prostaglandins zur E,F oder D Gruppe richtet sich nach der Anordnung der Sauerstoffunktion am Cyclopentanring.So trägt die Gruppe der E Prostaglandine an C 9 eine Keto- an C 11 eine Hydroxylgruppe,der F Prosta-

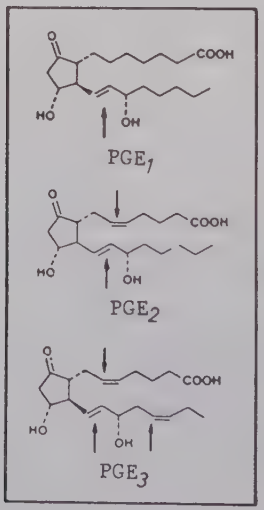
glandine an C 9 und C 11 eine Hydroxylgruppe,der D Prostaglandine an C 9 eine Hydroxyl- und an C 11 eine Ketogruppe die Reihe ließe sich in dieser Weise fortführen (Abb. 1).

Abb. 1 : Chemischer Aufbau der Prostaglandine (Schrör 1983)



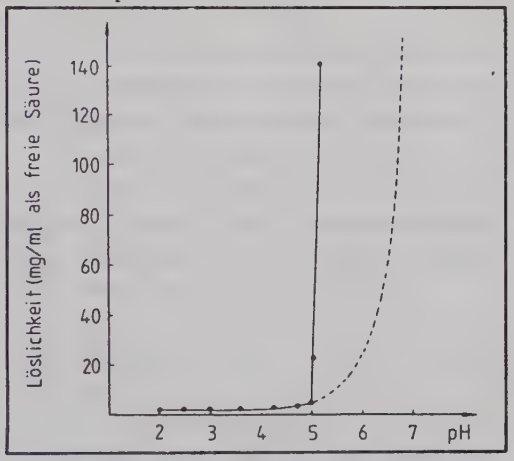
Die Einteilung dieser Kürzel geht auf den Entdecker der Prostaglandine, Ulf von Euler (1935), zurück.
Er gewann durch Extraktion aus der menschlichen Vorsteherdrüse (Prostata) ein Substanzgemisch, das sich durch Verteilung zwischen Äther (engl. ether - PGE_2) und Phosphatpuffer (schwed. fosfat - $PGF_{2\alpha}$) auftrennen ließ.
"Dabei wäre anzumerken, daß PGF_2 in der Literatur im allgemeinen als $PGF_{2\alpha}$ erscheint, wobei α die räumliche Konfiguration am C 9 beschreibt. Da das β-Isomere jedoch natürlicherweise bei Säugetieren nicht vorkommt, sondern nur durch die Hand des Chemikers durch Reduktion ($NaBH_4$) von PGE_2 entsteht, wäre das Suffix α eigentlich entbehrlich" (Riefling 1983).
Die Zahl nach der Gruppenbezeichnung gibt die Anzahl der Doppelbindungen an. So hat PGE_1 eine trans-Doppelbindung zwischen C 13 und C 14, PGE_2 zusätzlich eine cis-Doppelbindung zwischen C 5 und C 6 . Die Einführung einer weiteren cis-Doppelbindung zwischen C 17 und C 18 würde folglich zum PGE_3 führen (Abb. 2).

Abb. 2 : Strukturormel der Prostaglandine E_1, E_2, E_3
(Riefling 1983)



Die primären Prostaglandine und ihre Metaboliten weisen auf Grund ihres sehr ähnlichen Aufbaus ähnliche chemische Eigenschaften auf,zeigen jedoch auch sehr unterschiedliche Reaktionen.
Ihr pK_a liegt zwischen 4,8 und 5,0 ,d.h.unter pH 4,8 nimmt der lipophile und über pH 5,0 der hydrophile Charakter der Prostaglandine zu (Stehle 1982).
Die Carboxylgruppe trägt einmal eine -OH Gruppe (pH <4,8), das Molekül ist damit ungeladen und daher fettlöslich,zum anderen O^- + H^+ (pH >5,0),d.h. geladen und damit wasserlöslich (Abb. 3).

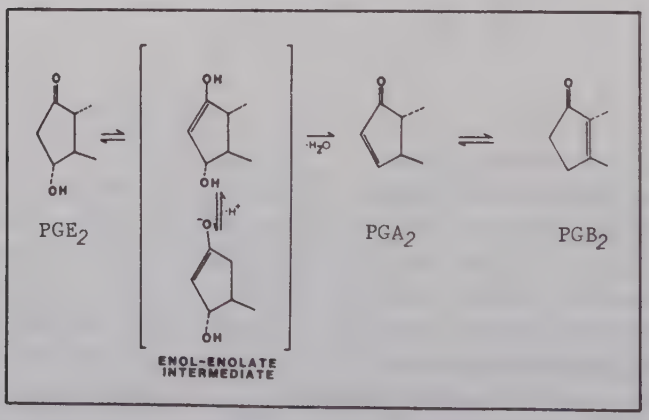
Abb. 3 : Wasserlöslichkeit von $PGF_{2\alpha}$ bei 25°C in Abhängigkeit vom pH (Stehle 1982)



Diese Tatsache findet bei der Extraktion von Prostaglandinen aus Substanzgemischen (biologische Proben) seine praktische Anwendung.Durch Ansäuern der zu untersuchenden Lösung wird das Prostaglandinmolekül in den lipophilen Zustand versetzt und kann jetzt mit Äther,Chloroform und ähnlichen Stoffen extrahiert werden,d.h. die verschiedenen Prostaglandine wandern in die Ätherphase und können aus ihr isoliert werden,oder,wie bei uns mit C 18 beschichteten Silikagelkartuschen durchgeführt,an stationäre fettartige Stoffe gebunden werden.

Große Unterschiede zeigt die Familie der Prostaglandine in ihrer Stabilität gegenüber chemischen und physikalischen Einwirkungen (Stehle 1982).
$PGF_{2\alpha}$ und sein Blutmetabolit PGFM erweisen sich als relativ stabil gegen chemischen Abbau,diese Stabilität wird in wäßrigem Milieu durch Erhöhung des pH noch verstärkt. Durch Temperaturerhöhung werden jedoch auch bei ihnen wie bei den anderen Prostaglandinen die Um- und Abbaureaktionen beschleunigt.
Prostaglandin E_2 und der erste Blutmetabolit PGEM dagegen sind sehr anfällig gegen chemische und physikalische Einwirkungen;PGD_2 verhält sich ihnen analog.
PGE_2 wird sehr rasch,besonders in wäßriger Lösung, zu PGA_2 bzw. PGAM und weiter zu PGB_2 dehydratisiert. Das Maximum an Stabilität bei Raumtemperatur besitzt die E-Gruppe noch bei pH 3-4.Unter pH 2 und über pH 8 wird die Dehydratisierung stark beschleunigt.So wird in stark alkalischem Milieu das PGE_2 Molekül binnen weniger Sekunden in PGB_2 umgewandelt (Abb. 4).

Abb. 4 : Abbauschema von PGE_2 zu PGB_2 (in wäßriger Lösung) (Stehle 1982)



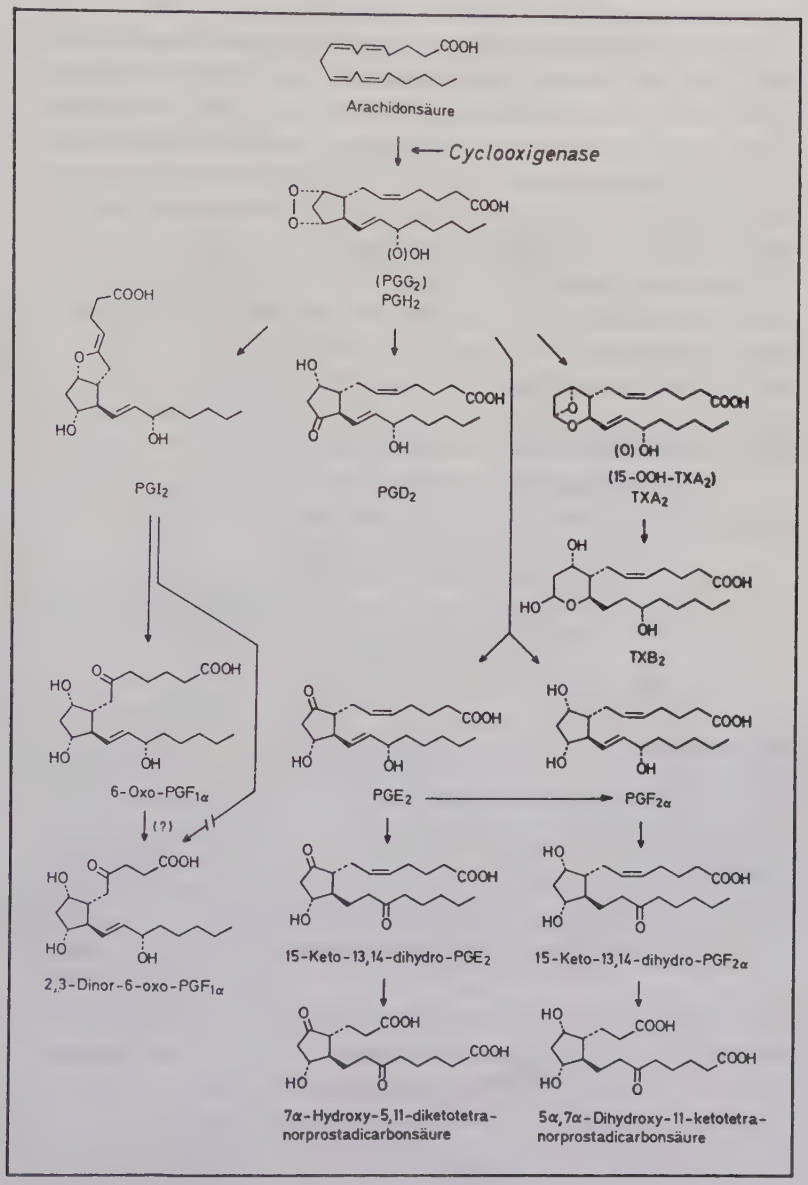
Selbst in absolutem Äthanol ist die Familie der E-Prostaglandine nur begrenzt haltbar.Wobei die Geschwindigkeit der Abbaureaktion abhängig ist von der Menge an gelöster Substanz pro ml Lösungsmittel.So wird PGE_2 in absolutem Äthanol bei 25°C in einer Konzentration von 1 mg/ml in 6 Monaten,von 0,1 mg/ml in 1 Monat zu 50% in PGA_2 umgewandelt (Stehle 1982).Starke Temperatursenkung verlangsamt diese Reaktion,verhindert sie jedoch nicht.
Diese Instabilität der Prostaglandine der E-Gruppe führte dazu,daß viele Untersucher nicht PGE_2 bzw. PGEM in einer Probe nachzuweisen versuchen,sondern deren Abbauprodukte. So messen Schlegel et al. nicht PGEM,sondern das stabilere PGAM,dessen Bildung durch Temperaturerhöhung (18 Stunden bei 45°C) beschleunigt wird,als Marker für die PGE_2 Synthese.Noch weiter gehen Granström et al. (1982a),die,in derselben Absicht,durch Alkalibehandlung das Endprodukt des PGEM Abbaues,das 11-deoxy-15-keto-13,14-dihydro-11β,16ε-cyclo PGE_2 erzeugen und nachweisen.

Noch rascher als beim PGE_2 verläuft der Abbau beim Prostacyclin,das bei pH 7,4 und Zimmertemperatur in Minuten zu 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ hydrolysiert.Der Nachweis dieser Substanz gestaltet sich demgemäß schwierig.

B,Biosynthese

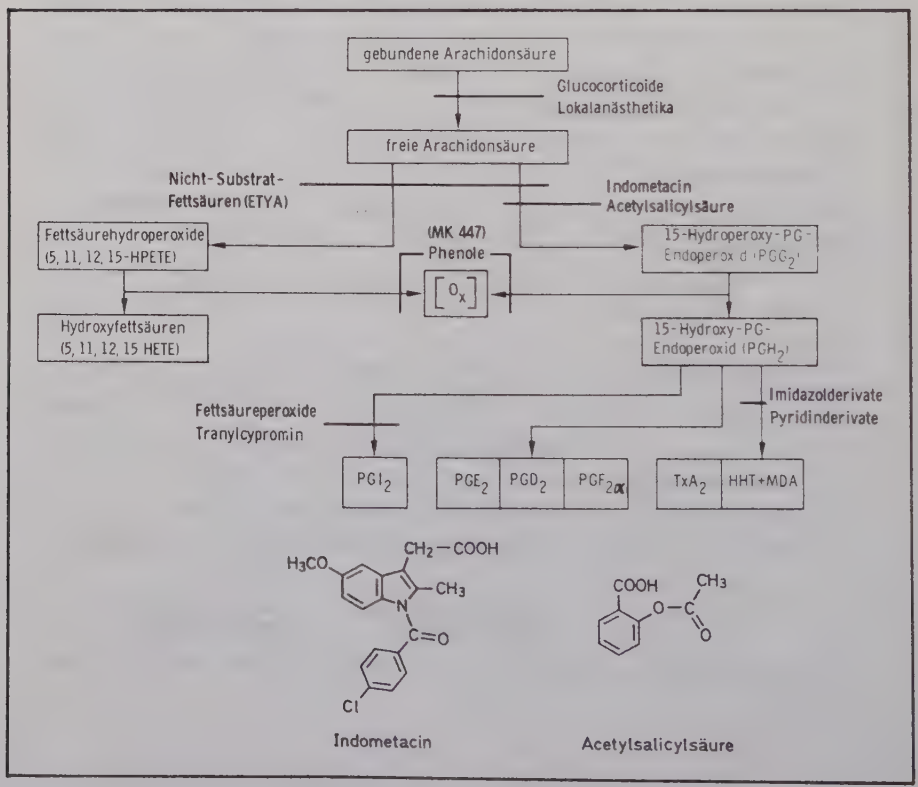
Prostaglandine werden im Säugetierorganismus nicht gespeichert.Bei Bedarf kommt es zu einer raschen Neusynthese, die im endoplasmatischen Reticulum nahezu aller Körperzellen ablaufen kann.
Ausgangsmaterial dieser Synthese sind essentielle Fettsäuren der Linolsäuregruppe,die zur eigentlichen Vorstufe der Prostaglandine,der Arachidonsäure,dehydriert werden können.Diese unmittelbaren Vorstufen der Prostaglandinbiosynthese werden als Phospholipide gespeichert,die bei Bedarf freigesetzt und zur Prostaglandinsynthese eingesetzt werden können.So stimuliert die Aktivierung der Phospholipasen durch physiologische oder unphysiologische (z.B. Trauma) Reize die Prostaglandinbiosynthese (Flower und Blackwell 1976).Die dabei als Vorstufe gebildete Arachidonsäure wird durch das Enzym Cyclooxigenase in die äußerst kurzlebigen Endoperoxide PGG_2 und PGH_2 umgewandelt,die die Ausgangsstufe für die primären Prostaglandine,Thromboxane und Prostacycline bilden (Cyclooxigenaseweg) (Abb. 5).
In der Literatur wird als Produktionsort der am Zyklusablauf des Rindes beteiligten Prostaglandine der Uterus angegeben. Der Übertritt in das eigentliche Erfolgsorgan Ovar geschieht mittels des sogenannten "counter current".D.h. die Ovararterien bilden ein enges Geflecht um die Uterusvene,der Übertritt der Prostaglandine soll hier durch Diffusion stattfinden (Ginther und Del Campo 1973 und 1974,Coudert et al. 1974, Baird und Land 1973,Lamond und Drost 1974).Ein Carriermechanismus wie er im Lungengewebe beschrieben wurde (Bito et al. 1977) ist hier nicht nachgewiesen.
Ein alternativer Stoffwechselweg,katalysiert durch das Enzym 5-Lipoxigenase,führt zu weiteren biologisch aktiven Produkten,z.B. den Leukotrienen (Samuelsson et al. 1980).

Abb. 5 : Arachidonsäuremetabolismus (Schrör 1983)



Der Cyclooxigenaseweg der Prostaglandinbiosynthese kann durch verschiedene Reagenzien gehemmt werden.Glukokorticoide unterbrechen die Synthese auf der Phospholipase A_2 Stufe;die Wirkung von Aspirin und Indometacin beruht auf einer Hemmung der Cyclooxigenase (Flower 1974,Orczyk und Behrman 1972).Aspirin inaktiviert die Cyclooxigenase durch Acetylierung einer Aminogruppe im aktiven Zentrum des Enzyms.Indometacin tritt in Kompetition mit der Arachidonsäure an der "binding site" der Cyclooxigenase und verhindert so die Prostaglandinsynthese (Abb. 6).
Die genannten Hemmstoffe werden therapeutisch auf Grund ihrer entzündungshemmenden Wirkung (Prostaglandine als Entzündungsmediatoren) besonders auf dem Gebiet der Arthritiden eingesetzt.

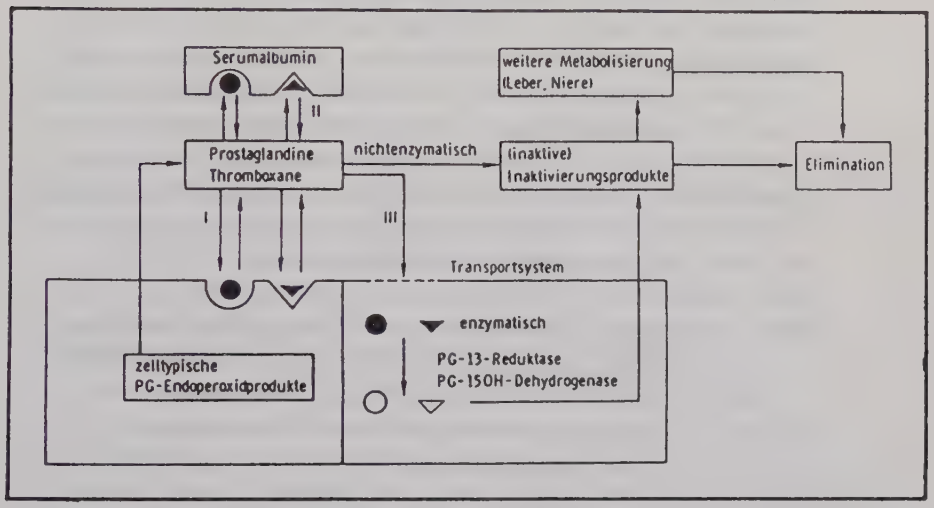
Abb. 6 : Hemmstoffe der Prostaglandinbiosynthese und ihre Angriffspunkte (Schrör 1983)



C,Metabolismus

Prostaglandine können praktisch in allen Körperzellen gebildet werden,ihre Wirkung bleibt jedoch auf die unmittelbare Umgebung des Entstehungsortes beschränkt,da ihr Abbau sehr rasch erfolgt (Abb. 7)

Abb. 7 : Prinzipielle Inaktivierungsmechanismen von Prostaglandinen und Thromboxanen (Schrör 1983)

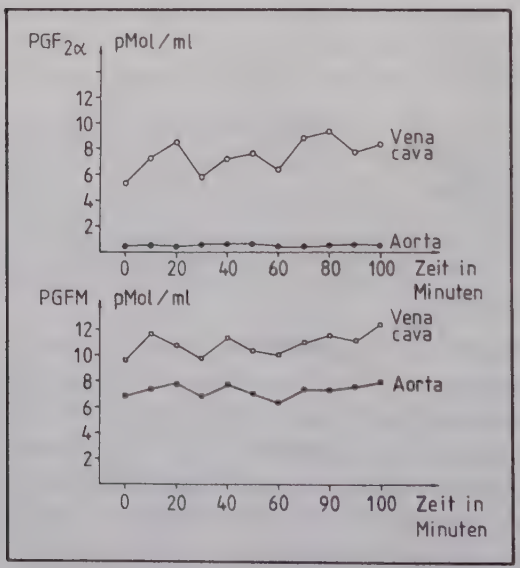


Prostaglandine und Thromboxane werden nach Biosynthese freigesetzt und an Rezeptoren der Zellmembran der gleichen oder benachbarten Zellen gebunden (I).Diese Rezeptorwechselwirkung führt zum biologischen Effekt.Daneben werden in das Blut freigesetzte Produkte an Serumalbumin gebunden (II) oder über ein Transportsystem wieder in die Zelle aufgenommen und metabolisiert (III).Die Metabolite werden freigesetzt,evtl. weiter metabolisiert (Lunge,Leber,Niere) und ausgeschieden.

Die primären Prostaglandine E_2 und $F_{2\alpha}$ werden dabei binnen kürzester Zeit (<1 Min.) durch die Enzyme 15-hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase und die Δ13-Reduktase in ihre 13,14-dihydro-15-keto-Derivate umgewandelt,die als Hauptmetaboliten bei allen untersuchten Tierarten auftreten (Granström und Kindahl 1982b).Die für diesen Umbau verantwortlichen Enzyme sind in fast allen Geweben im Säugetierorganismus nachzuweisen.

Der Hauptabbau erfolgt jedoch in der Lunge,bei deren Passage mehr als 90% der im Blut enthaltenen primären Prostaglandine abgebaut werden.Die Geschwindigkeit dieses enzymatischen Abbaus zeigt charakteristische Speziesunterschiede; am raschesten erfolgt er beim Meerschweinchen.
Die 13,14-dihydro-15-keto-Metaboliten gelten im allgemeinen als biologisch inaktiv,obwohl eine Arbeit von Milvae und Hansel (1983) beim Rind das Gegenteil zu beweisen scheint.Dabei wurde durch intramuskuläre Injektion von PGFM beim Rind die Luteolyse eingeleitet.
Für die Bestimmung von primären Prostaglandinen,die bei Reproduktionsvorgängen freigesetzt werden,bedeutet dies, daß sie in Blutproben,die noch keine Lungenpassage hinter sich haben,durchgeführt werden muß.Das Blut muß also entweder direkt aus Uterus- oder Ovarvenen,oder nach deren Einmündung in die Vena cava caud. aus diesem Gefäß gewonnen werden.(Abb. 8 - Ergebnis einer unveröffentlichten Untersuchung aus dem Institut für Physiologie)

Abb. 8 : Plasmakonzentrationen an $PGF_{2\alpha}$ und PGFM in Vena cava caud. und Aorta abd. (nach Lungenpassage) Versuchstier "EOS" Tag 2 p.p.



Der Weiterabbau der 13,14-dihydro-15-keto-Metaboliten erfolgt durch β- (Leber,Niere) und ω-Oxidation (Leber) zu den entsprechenden Tetranor- bzw. Dicarbonsäuren (Abb. 9). Das Rind stellt diejenige Tierart dar, bei der PGFM am längsten im Blutkreislauf zirkuliert,ohne durch derartige Oxidation angegriffen zu werden (Granström et al. 1982b) Bei vielen anderen Spezies stellen die 11-ketotetranor-Metaboliten gute Parameter der originären Prostaglandinbildung,besonders bei infrequenter Blutprobenahme,dar. Die Ausscheidung der Abbauprodukte erfolgt über die Nieren. Der im Urin auftauchende Metabolit des Prostaglandins $F_{2\alpha}$ ist die 5α,7α-dihydroxy-11-ketotetranorprostan-1,16-Dicarbonsäure (Samuelsson et al. 1975).
Thromboxan A_2 und Prostacyclin sind in wäßrigem Milieu so instabil,daß sie auf rein chemischem Wege,also ohne Enzymeinfluß,mit einer Halbwertszeit von <30 Sek. (TxA_2) bzw. wenigen Minuten (PGI_2),zu Thromboxan B_2 bzw. 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ hydrolysiert werden (Stehle 1982).
Ein weiterer Stoffwechselweg wird durch das Enzym 9-Oxidoreduktase eröffnet,das verschiedene Prostaglandine ineinander umwandeln kann.Die Aktivität dieses Enzyms zeigt wieder ausgeprägte Speziesunterschiede.Besonders hoch ist sie bei Kaninchen und Ratte,bei denen nach Injektionen von $PGF_{2\alpha}$ bzw. PGE_2,hohe Prozentanteile des jeweils anderen Prostaglandins nachzuweisen sind.Bei allen anderen Haustieren scheint die Aktivität dieses Enzyms eher gering zu sein (Granström und Kindahl (1982b).

D,Pharmakologie

Die Prostanoide zeigen eine verwirrende Vielfalt von physiologischen und pharmakologischen Wirkungen.
Diese Vielfalt beruht auf der Eigenschaft der Prostaglandine,bei verschiedenen Konzentrationen Wirkungsänderungen oder sogar eine Wirkungsumkehr zu zeigen.
PGE_2 z.B. erweitert in niedriger Dosis die Blutgefäße, in höherer Dosierung verengt es sie jedoch (Tuvemo und Strandberg 1975).Die einzelnen Spezies zeigen zudem ausgeprägte Unterschiede in der Ansprechbarkeit auf verschiedene Prostaglandine.
Das Problem der Beurteilung der physiologischen Bedeutung oder pharmakologischen Wirkung eines bestimmten Prostaglandins beruht darauf,daß physiologische Zustände durch ein im Gleichgewicht befindliches System verschiedener Prostaglandine kontrolliert werden.Eine Verschiebung dieses Gleichgewichts beeinflußt demnach die ganze Reihe der beteiligten Prostaglandine.
"Eine Hauptaufgabe der Prostaglandine besteht in der Cytoprotektion,d.h. dem Schutz des Magen-,Herz-,Leber- und Gehirngewebes gegenüber aggressiven Agentien (z.B. HCl im Magen,CCl_4 in der Leber usw.)"(Riefling 1983).
Einige therapeuthisch nutzbare Wirkungen sind in der folgenden kurzen Aufstellung stichpunktartig zusammengefaßt :

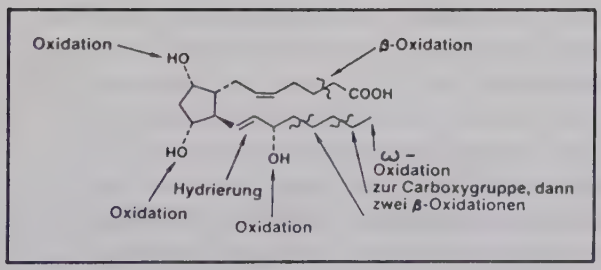
PGA_2 : schwach gefäßerweiternd
PGB_2 : unwirksam
PGC_2 : gefäßerweiternd
PGD_2 : blutgerinnungshemmend
PGE_2 : gefäßerweiternd,abortiv,diarrhoeauslösend
$PGF_{2\alpha}$: gefäßverengend,abortiv,luteolytisch
PGG_2/PGH_2 : blutgerinnungsfördernd,glatte Muskulatur kontrahierend
PGI_2 : stark gefäßerweiternd,blutgerinnungshemmend
TxA_2 : gefäßverengend,blutgerinnungsauslösend
6-keto-$PGF_{1\alpha}$: unwirksam
6-keto-PGE_1 : gefäßerweiternd,blutgerinnungshemmend

Leukotriene : Einfluß im Allergie- und Entzündungsgeschehen
"slow reacting substance of anaphylaxis"

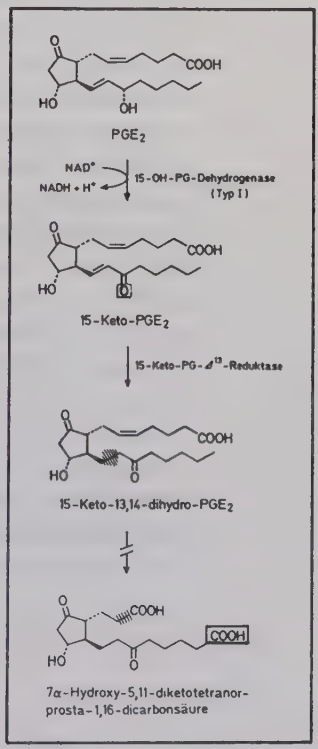
Diese grobe Zusammenstellung von Prostaglandinwirkungen ist keinesfalls vollständig,soll aber genügen,um einen Einblick in die Wirkungsvielfalt der Prostaglandine zu geben.
Das einzige Prostaglandin,das in der Tiermedizin weite praktische Anwendung findet,ist $PGF_{2\alpha}$ und bestimmte Analoga, die insbesondere zur Luteolyse- und Aborteinleitung,zur Brunstsynchronisation und auch bei der Behandlung von Endometritiden häufig eingesetzt werden.Verwendet wird hierbei jedoch nicht das originäre $PGF_{2\alpha}$,sondern bestimmte Analoga,wie z.B. Cloprostenol,da die erwünschte Wirkung bei Einsatz des originären Prostaglandins nur durch intrauterine Applikation oder bei anderer Applikationsart durch sehr hohe Dosen mit unerwüschten Nebeneffekten zu erzielen wäre (Johnson 1981).

Abb. 9 : a,Schema Prostaglandinabbau
b,Abbau von PGE_2 über PGEM zur 7α-hydroxy-5,11-diketo-tetranorprosta-1,16-Dicarbonsäure

a,



b,



II.Aufgabenstellung

Erstes Ziel dieser Arbeit war,die Messung der primären Prostaglandine $PGF_{2\alpha}$ bzw. PGE_2 und ihrer Blutmetaboliten PGFM bzw. PGEM zu ermöglichen.
Arbeiten von Caldwell et al. (1971),Demers et al. (1983), Granström et. al. (1982a),Kindahl (1978 und 1981b),Morris et al. (1981),Schlegel et al. (1982),Thomas et al. (1978) und Youssefnejadian et al. (1974) befassen sich sehr ausführlich mit der Problematik der Prostaglandinbestimmung und gaben einige Anregungen.
Durch Bestimmung der Halbwertszeit der Blutmetaboliten sollte die Frage geklärt werden,inwieweit die Messung dieser Metaboliten Rückschlüsse auf die Freisetzung der primären Prostaglandine erlaubt.
Nach diesen Vorarbeiten steht die Untersuchung von Wirkung und Aufgabe der Prostaglandine im Zyklus des Rindes im Vordergrund.
Auf die Ergebnisse der Untersuchungen von verschiedenen Autoren,wie Roberts et al. (1975),Fairclough et al. (1975 und 1982),Lamond et al. (1973) und insbesondere der Arbeitsgruppe um Edquvist und Kindahl,aufbauend,sollten die Wechselbeziehungen der $PGF_{2\alpha}$-,Ocytocin- und Progesteron-Freisetzung geklärt werden.Diese Aufgabe könnte am ehesten durch sehr frequente Blutentnahmen und damit Feststellung auch von Kurzzeitschwankungen dieser Hormone gelöst werden.
Der enge Zusammenhang von $PGF_{2\alpha}$ und Ocytocin wird von verschiedenen Autoren betont (Armstrong und Hansel 1959,Chan et al. 1974,Ellendorff et al. 1979,Flint und Sheldrick 1982, Ginther et al. 1967,Milvae und Hansel 1980,Newcomb et al. 1977,Schams und Karg 1980 und 1982,Webb et al. 1981).
Dabei konnte sowohl durch Gabe von $PGF_{2\alpha}$ Ocytocin freigesetzt werden,als auch durch Gabe von Ocytocin $PGF_{2\alpha}$.
Ocytocingaben verkürzten den Zyklus bei Rind und Schaf.

III,Experimentelles

A,MATERIALIEN

1.Chemikalien,Biochemica

N,N'- Carbonyldiimidazol,rein ca. 98% (Serva 16030)
N,N'- Dimethylformamide,99 % (Aldrich-Europe D 15855-0)
Salzsäure 1 N Lösung (Merck 9057)
Szintillationsflüssigkeit : Rialuma (J.T. Baker Chemicals 8582)

Biochemica :

$PGF_{2\alpha}$ Prostaglandin $F_{2\alpha}$ pharm. Serva 33735
PGFM Upjohn Diagnostics/The Upjohn Company Kalamazoo,Michigan 49001,USA Nr. 468915
PGE_2 PGE_2 rein min. 95% Serva 33733
PGEM 1 mg Reinsubstanz freundlicherweise von W.Schlegel,Münster,zur Verfügung gestellt

Tritiummarkierte Prostaglandine,alle von Amersham,Buchler

$PGF_{2\alpha}$ 5,6,8,9,11,12,14,15(N)- ^3H
TRK 464,180 Curies/mMol,Reinheit 98%
PGFM 5,6,8,11,12,14 (N) - ^3H
TRK 517, 80 Curies/mMol,Reinheit 95%
PGE_2 5,6,8,11,12,14,15 (N) - ^3H
TRK 431,160 Curies/mMol,Reinheit 98%
PGEM 5,6,8,11,12,14 (N) - ^3H
TRK 521, 80 Curies/mMol,Reinheit 94 %

2.Geräte,spezielle Materialien

Szintillationszähler : Berthold bf betaszint 5000/3000
Zählausbeute ca. 29,9%
Beckman LS 7000
Zählausbeute ca. 35,1%

Zählküvetten : MINI-VIALS-6 (J.T. Baker Chemicals 4598)
"Baker" disposable extraction columns (Octadecyl C 18 Kartuschen 1 ml) (J.T. Baker Chemicals 8865)
Pumpen : "µ-Flow" Beckmann 112 Solvent Delivery Module
Probengeber : Altex vent 210
Säule : Glas Kartusche 150-3,Li chrosorb R.P. 18;5 µm
150 x 3 mm,Nr. 685505
Thermostat : Haake Typ FE,Karlsruhe
Fraktionssammler : Fraction Collector FRAC-100,Pharmacia Fine Chemicals
Probenspritze : 1 ml Record-Spritze,Pharma-Plast Lab.
Kühlzentrifugen : Jouan K 110 SX
Heraeus Christ Cryofuge 6-6
Sigma 4 K 1
Kleinzentrifuge Heraeus Christ Labofuge III
Schüttler : Vortex Genie (Bender & Hobein,München)
Schüttelwasserbad Typ 3047 Köttermann Hänigsen
Magnetrührer IKA-Combimag Ret (Janke & Kunkel)
Vakuumtrockenschränke : Typ RVT 500 (Heraeus Christ)
Typ RVT 360 (Heraeus Christ)
Peristaltikpumpe Perpex (LKB-Producter AB Nr. 10202)
Rechner : Commodore 4016
Drucker : 9871 A Hewlett Packard
Gefriertrockner : Uni-Trap Model 10 - 100 (Virtis Com.)
Pipetten : Eppendorf 50,100,200,500,1000
Gilson microman M 50,M 250
Dispensetten : 2;5;10 ml (Brand)
Pipettierautomat : Multilutor 1/0,1 (Brand 82238)
Heparinisierte Proberöhren 10 ml 95 x 16 mm (Sarstedt 26356)
Reagenz- und Zentrifugenröhren (Sarstedt 55473)
Injektionskanülen 0,4 x 21 mm (Erosa Nr. 20)
Sterilfilter SM 16527
Visking Dialysierschlauch 20/32 (Serva 44110)
Einmalspritzen 10 ml DIN 13098 (Braun Melsungen 460610/8)

Glaswaren

Extraktionsgläser : Gewindegläser (DIN 22)
57 x 27,3 mm (Vol. ca. 20 ml),Schraubdeckel mit zinnfolienbeschichteter Preßkorkdichtung

Reagenzgläser mit Bördelrand und Rundboden :

"groß"	99 x 16 mm,Vol. ca. 15 ml
"klein"	75 x 14 mm,Vol. ca. 9 ml

Pasteur Pipetten ca. 150 mm (Brand 747715)

3.Lösungsmittel,Puffer

Acetonitril p.a. (Merck 4727)
Methanol z.a. (J.T. Baker Chemicals 8045)

Gelatinepuffer
1,0 g Gelatine weiß extrafein DAB 7 (Merck 4972)
Phosphatpuffer pH 7,2 ad 1 l

Gelatine-Albuminpuffer 0,67%
6,7 g Rinderserumalbumin (Serva 11930)
Gelatinepuffer ad 1 l

Kohlesuspension :

0,2%	2,0 g Aktivkohle Norit A (Serva 30890)
	0,2 g Dextran (Serva 18680)
	H_2O bidest. ad 1 l
0,4%	4,0 g Aktivkohle
	0,4 g Dextran
	H_2O bidest. ad 1 l

Methanol/Phosphatpuffer 60/40
600 ml Methanol
320 ml H_2O bidest.
80 ml Phosphatpuffer pH 7,2

Phosphatpuffer pH 7,2

2,69 g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck 4873)
8,34 g Dinatriumhydrogenphosphat (Merck 6380)
0,33 g Natriumazid (Merck 6688)
25,0 ml Prostaglandinstabilisator
H_2O bidest. ad 1 l (pH-Wertkontrolle am pH-Meter)

Prostaglandinstabilisator

0,3 M EDTA (Titriplex III Merck) 111,7 g
1% Aspirin (Acetylsalicylsäure) 10,0 g
Substanzen in 200 ml H_2O bidest. aufnehmen
pH 7,4 durch Zugabe von 15% NaOH einstellen
H_2O bidest. ad 1 l
Aufbewahren bei Zimmertemperatur

Trispuffer 20 mM pH 8,5

2,42 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck 8362)
800 ml H_2O bidest.
mit 1 N Salzsäure am pH-Meter auf 8,5 einstellen
200 ml Methanol z.a.

B,Analytische Methoden

1.Vorreinigung von Plasmaproben

Die bei -20°C gelagerten Plasmaproben werden bei 37°C rasch aufgetaut und sofort danach in ein Eisbad verbracht. Die Proben werden gründlich geschüttelt und Plasmamengen, je nach erwarteter Prostaglandinkonzentration von 0,1 bis 2,5 ml,in ebenfalls eisgekühlte große Reagenzgläser pipettiert,üblicherweise 1,0 ml.Die eingesetzte Plasmamenge wird bis 2,5 ml mit H_2O bidest. aufgefüllt,mit 1,25 ml 100% Methanol versetzt und geschüttelt.Der Methanolgehalt von 33% bewirkt die Fällung einiger Plasmaproteine und damit eine erste Vorreinigung der zu untersuchenden Probe. Prostaglandine sind bei einem physiologischen pH von 7,4 gut wasserlöslich und sehr gut löslich in alkoholischer Lösung.Sie bleiben also bei der Fällungsreaktion im Überstand (Methanolextraktion).
Das Plasma-Methanol-Wasser Gemisch wird mindestens 1 Stunde im Eisbad,besser über Nacht bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt,um die Fällung möglichst vollständig zu gestalten. Daraufhin wird 10 Minuten bei 3500 U/Min. zentrifugiert und der Überstand in große Reagenzgläser abgekippt.
Der Bodensatz wird mit 2,0 ml 40% Methanol überschichtet, gründlich geschüttelt und ca. 10 Minuten bei Zimmertemperatur nachextrahieren lassen.
Wahlweise wird die Nachextraktion auch folgendermaßen durchgeführt.Zum Bodensatz und ersten Überstand werden 0,6 ml H_2O zugegeben,dann der Bodensatz mit 0,8 ml 100% Methanol überschichtet,geschüttelt und nachextrahieren lassen.Die Reihenfolge,erst Wasser,dann Methanol muß unbedingt eingehalten werden,da bei zu hoher Methanolkonzentration die Extraktionsausbeute absinkt.Diese Methode erbringt bei geringfügig niedrigerer Ausbeute klarere Nachextrakte und die nachfolgende Kartuschenreinigung ist leichter durchzuführen.Die Nachextrakte werden 10 Minuten bei 3500 U/Min. zentrifugiert und die Überstände vereinigt.

Nach dieser groben Reinigung der Plasmaproben von Proteinen und gleichzeitiger Alkoholextraktion der Prostaglandine erfolgt eine Säulenchromatographie mit "Baker" Octadecyl (C 18) beschichteten Minikartuschen.Dazu werden die Extrakte mit 1 N Salzsäure angesäuert,bis der pH-Wert auf 3,5 gesunken ist.Üblicherweise werden bei 1,0 ml Plasma 0,2 ml 1 N HCl verwendet,bei größerer Plasmamenge entsprechend mehr.Diese Ansäuerung ist notwendig,um die Prostaglandine fettlöslich zu machen und damit eine Adsorption an die C 18 Kartusche zu ermöglichen. Die Proben zeigen nach Zugabe der Säure eine leichte Trübung,werden aber nach gründlichem Schütteln klar und können nun auf die zuvor gereinigten Minikartuschen aufgetragen werden (Vorbereitungs- und Reinigungsschema Abb. 13).
Die Reagenzgläser werden mit 4,0 ml 40% Methanol nachgespült und diese Lösung ebenfalls über die Kartusche gegeben.Dieser Reinigungsschritt desorbiert hydrophile Substanzen.Nun wird durch Auftragen von 3,0 ml Trispuffer pH 8,5 der pH-Wert geändert und damit die Löslichkeit der Prostaglandine in wäßrigem Milieu erhöht.Die Elution erfolgt mit 1,0 ml Methanol/Phosphatpuffer 60/40 pH 7,2 in kleine Glasreagenzgläser.
Anschließend werden die Kartuschen mit 2 ml 100% Methanol von allen lipophileren Stoffen gereinigt,mit 2 ml 40% Methanol äquilibriert und sind nun bereit zur Aufnahme der nächsten Plasmaprobe.
Die Eluate werden zur Prostaglandinbestimmung im Radioimmuntest eingesetzt.

2.Radioimmuntest

a,Radioimmuntest nach Vorreinigung

Das Prinzip des RIA liegt in der Verknüpfung der hohen Nachweisempfindlichkeit radioaktiv markierter Substanzen mit der hohen Spezifität immunologischer Reaktionen.
Der Antikörper kann zwischen radioaktiv markierter Substanz und der zu bestimmenden unmarkierten Verbindung nicht unterscheiden.Durch Zugabe der radioaktiv markierten Substanz im Überschuß,über die Bindungskapazität des Antiserums hinaus,liegt immer freie markierte Substanz vor. Durch Zugabe von unmarkiertem Antigen (Probe) wird radioaktiv markiertes Antigen vom Antikörper verdrängt (Kompetition).Durch Aktivkohlebehandlung kann das freie vom antikörpergebundenen Prostaglandin getrennt werden (freies wird adsorbiert).
Durch Vergleich der Aktivität im Überstand von unbekannten Proben mit der aus Zugabe definierter Mengen des betreffenden Antigens resultierenden Aktivität kann auf die Konzentration der unbekannten Proben rückgerechnet werden (Eckert und Strecker 1978).

Gesamtaktivität (GA) :
Die Gesamtaktivität wird durch den Zusatz von 100 µl tritiummarkierten Prostaglandins zu Gelatinepuffer (Albuminzusatz bei PGE_2,PGEM),ohne Aktivkohle- und Antikörperbehandlung, gemessen.Als Aktivität werden ca. 4000 - 5000 cpm angestrebt, um die Empfindlichkeit der Bestimmung zu gewährleisten (auch Kompetition mit geringen unmarkierten Prostaglandinmengen wird registriert).

0-Wert :
Die Bindungskapazität des verwendeten Antiserums wird durch Messung der aus dem Zusatz der tritiummarkierten Lösung resultierenden Aktivität,ohne Zugabe des entsprechenden

unmarkierten Prostaglandins bestimmt.Die Bindung sollte nach Abzug des NSB-Wertes zwischen 40% und 60% der Gesamtaktivität liegen,um die Sensitivität der Messung zu gewährleisten.Die weitere Behandlung der 0-Werte erfolgt wie bei der Bestimmung der unbekannten Proben.

Nicht-spezifische-Bindung (NSB) :
Die Bestimmung des NSB-Werte verläuft entsprechend der des 0-Wertes,jedoch ohne Antikörperbehandlung.Die Nichtspezifische-Bindung gibt also den Anteil der zugesetzten Aktivität wieder,der nicht an die Aktivkohle adsorbiert wird.Der NSB-Wert lag zwischen 1% ($PGF_{2\alpha}$,PGFM) und 3% (PGE_2,PGEM) der Gesamtaktivität.

Reagenzienleerwerte :
Um zu überprüfen,ob gemessene Prostaglandinkonzentrationen real vorliegen,oder auf Fehlmessungen,beruhend auf Verunreinigung verwendeter Reagenzien,wird pro verwendeter Minikartusche eine Reagenzienleerwertprobe aufgetragen. Diese Probe wird behandelt wie eine normale Plasmaprobe, enthält aber an Stelle von Plasma H_2O bidest.
Bei unseren Bestimmungen wurden keine Reagenzienleerwerte festgestellt.

Wiederfindung (Extraktionsausbeute) :
Die Messung der Aktivität von tritiummarkierten Zusätzen zu Plasma direkt aus dem Eluat wird als Marker für die Extraktionsausbeute der probeneigenen Prostaglandine verwendet.Der Zusatz von tritiummarkierten Prostaglandinen kann dabei auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden.

Interne Wiederfindung :
Diese Methode wurde von uns in der Anfangsphase der Prostaglandinbestimmung durchgeführt.Dabei werden 0,1 ml tritiummarkiertes Prostaglandin mit einer Aktivität von ca. 1000 cpm/0,1 ml zu den bereits mit H_2O bidest. aufgefüllten Plasmaproben zugegeben,desgleichen direkt zu Szintillatorflüssigkeit (100% Wert).

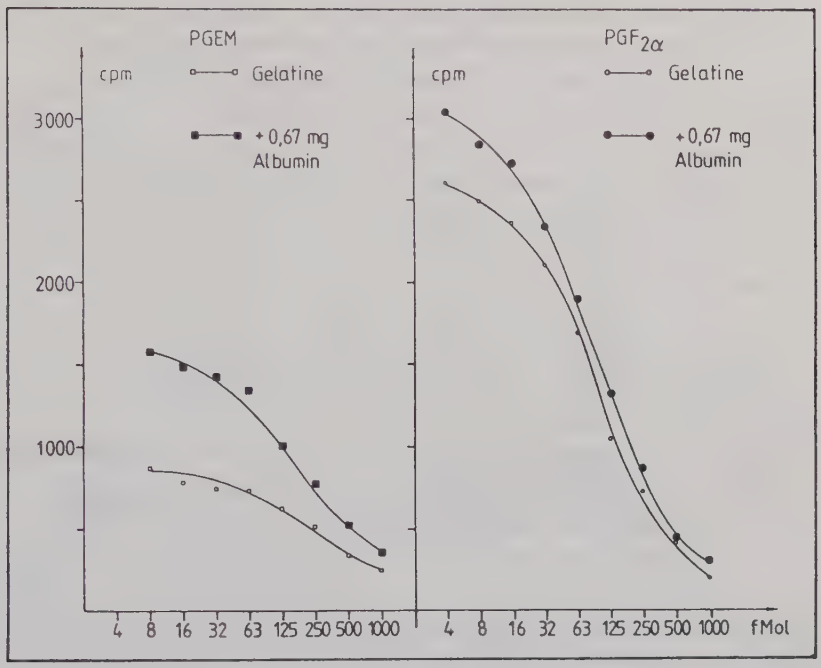
Nach der Kartuschenreinigung wird die Aktivität eines definierten Aliquots jeden Eluats gemessen.Der Vergleich dieser Aktivität mit dem 100% Wert ergibt die Wiederfindung der betreffenden Plasmaprobe.
Beispiel : Es sollen in einer Plasmaprobe zwei verschiedene Prostaglandine bestimmt werden.Dafür werden pro Eluat zweimal je 0,2 ml benötigt,d.h. es bleiben 0,6 ml Resteluat.Für die Wiederfindung werden davon 0,5 ml zu 4 ml Rialuma zugegeben und die Aktivität gemessen.
Die Berechnung der individuellen Wiederfindung gestaltet sich folgendermaßen : Die Aktivität des zur Wiederfindung eingesetzten Eluats wird auf 1,0 ml hochgerechnet,d.h. bei 0,5 ml Eluat gemessene Aktivität (cpm) x 2. Dieses Ergebnis wird durch die,für den 100%-Wert ermittelte, Aktivität (cpm) geteilt und ergibt nach Multiplikation mit 100 die prozentuale Wiederfindung der einzelnen Plasmaprobe.Die auf diese Weise errechnete Extraktionsausbeute wird zur Berechnung der realen Prostaglandinkonzentration einer Plasmaprobe eingesetzt.D.h. bei einer Wiederfindung von 80% und einer im RIA bestimmten Prostaglandinmenge von 100 fMol wird auf eine reale Prostaglandinkonzentration von 125 fMol/ml hochgerechnet. Der Variationskoeffizient der internen Wiederfindungen lag in der Regel unter 5%,d.h. individuelle Schwankungen sind sehr gering.
Externe Wiederfindung :
Bei dieser Methode wird pro Kartusche eine zusätzliche Plasmaprobe mit 0,1 ml radioaktiv markiertem Prostaglandin ca. 5000 cpm/0,1 ml angereichert,100% Wert entsprechend. Die Eluate der so angereicherten Plasmaproben werden direkt in Zählküvetten aufgefangen und die Aktivität gemessen.Das Verhältnis der Aktivität dieser Proben zur Aktivität des 100% Wertes x 100 ergibt die prozentuale Wiederfindung.Der Durchschnittswert der externen Wiederfindungen wird zur Berechnung der Prostaglandinmenge pro ml Plasma für alle in dem betreffenden Test untersuchten Plasmaproben eingesetzt.

Bei beiden Methoden lag die Wiederfindung der zugegebenen tritiummarkierten Prostaglandine zwischen 80% und 95% .

Bestimmung der einzelnen Prostaglandine :
Dazu wird vom Eluat ein Aliquot im Doppelansatz in vorbereitete kleine Reagenzgläser pipettiert.Die Menge wird nicht größer als 0,25 ml gewählt,da sonst Störeinflüsse durch die Einengung nicht auszuschließen sind.
Entsprechend diesem Aliquot wird die im Radioimmuntest gemessene Menge in Konzentrationen umgerechnet;z.B. Aliquot 0,1 ml bedeutet bei 1 ml eingesetztem Plasma einen Faktor 10,bei 0,5 ml Plasma einen Faktor 20,um auf die Prostaglandinmenge pro ml Plasma rückzurechnen.

$PGF_{2\alpha}$,PGFM
Zum Aliquot werden 0,1 ml tritiummarkiertes Prostaglandin in 99% Methanol,1% Glyzerin mit einer Aktivität von ca. 5000 cpm/0,1 ml zugegeben.Die Eichkurven,von 4-1000 fMol in Methanol/Phosphatpuffer 60/40 im selben Volumen wie die Aliquots der unbekannten Proben werden entsprechend behandelt.
Nach kräftigem Schütteln wird im Vakuumtrockenschrank bei max. 50°C eingeengt.Der Rückstand wird in 0,5 ml des jeweiligen Antiserum (Gesamtaktivität in 1,0 ml,Nicht-spezifische-Bindung in 0,5 ml Gelatinepuffer) aufgenommen.
Nach kräftigem Schütteln erfolgt eine zweimal 10 minütige Inkubation bei 37°C (nach den ersten 10 Minuten schütteln).
Mindestens eine Stunde Eisbad,besser über Nacht,führt zur Gleichgewichtseinstellung zwischen freiem und antikörpergebundenem Prostaglandin.
Die Abtrennung des ungebundenen Prostaglandins erfolgt durch Behandlung der Proben mit Aktivkohle (0,2%,0,5 ml).
Nach Zugabe der Aktivkohlelösung wird gründlich geschüttelt, 10 Minuten Wartezeit zur Adsorption der ungebundenen Prostaglandine an die Aktivkohle bei 4°C eingehalten und anschließend 10 Minuten bei 3000 U/Min.,4°C zentrifugiert.
Der Überstand wird zu 4 ml Rialuma dekantiert und die Aktivität im Szintillationszähler gemessen.
Durch Zusatz von 0,67 mg Albumin zum Inkubationsansatz kann die Sensitivität der Bestimmung,insbesondere im Bereich zwischen 4 fMol und 16 fMol,verbessert,und damit die Nachweisgrenze gesenkt werden (Abb. 10).

Abb. 10 : Einfluß von Albumin auf den Eichkurvenverlauf



PGE_2,PGEM

Die verwendeten Antisera (beide freundlicherweise von W.Schlegel,Münster,zur Verfügung gestellt) tolerieren eine gewisse Alkoholkonzentration (Tab. 1).

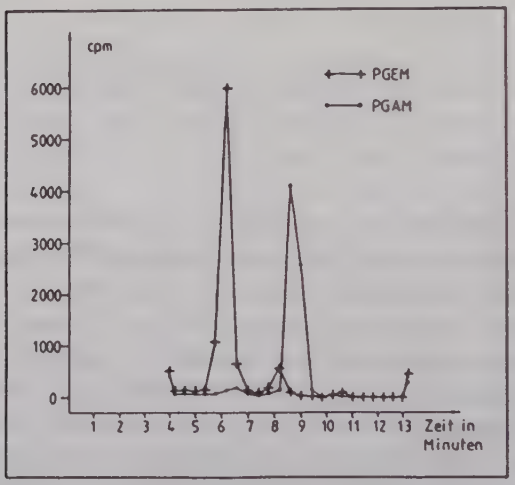
Aliquots bis zu einem Volumen von 0,1 ml können,bei Zugabe der tritiummarkierten Prostaglandine in 0,1 ml Gelatinepuffer,direkt mit Antiserum (Endverdünnung in 0,1 ml) überschichtet werden.Der Methanolgehalt muß dabei natürlich im gesamten Test (Eichkurve,unbekannte Proben) konstant gehalten werden.Größere Volumina als 0,1 ml müssen wie oben niedergetrocknet werden.

Die PGEM Messung wird nach der Vorschrift von W.Schlegel (unveröffentlicht) durchgeführt.Vor Zugabe des Antiserums wird PGEM durch eine 18-stündige Inkubation bei 45°C in das stabilere PGAM umgewandelt (Abb. 11).Der verwendete Antikörper reagiert spezifischer mit PGAM,als mit PGEM. Die Eichkurvenverdünnungen beinhalten 8 - 2000 fMol PGE_2 bzw. PGEM.

Tab. 1 : Methanolzusätze zum Inkubationsansatz (Endvolumen 0,8 ml)

µl Methanol	$PGF_{2\alpha}$	PGFM	PGE_2	PGEM
	relative Bindung in %			
0	100	100	100	100
20	93	96	95	97
40	87	83	94	92
60	72	67	83	90
80	68	55	78	80
100	62	43	72	75
120	54	37	63	74
140	43	29	57	66
160	40	24	51	62
180	34	18	47	58
200	29	15	41	51

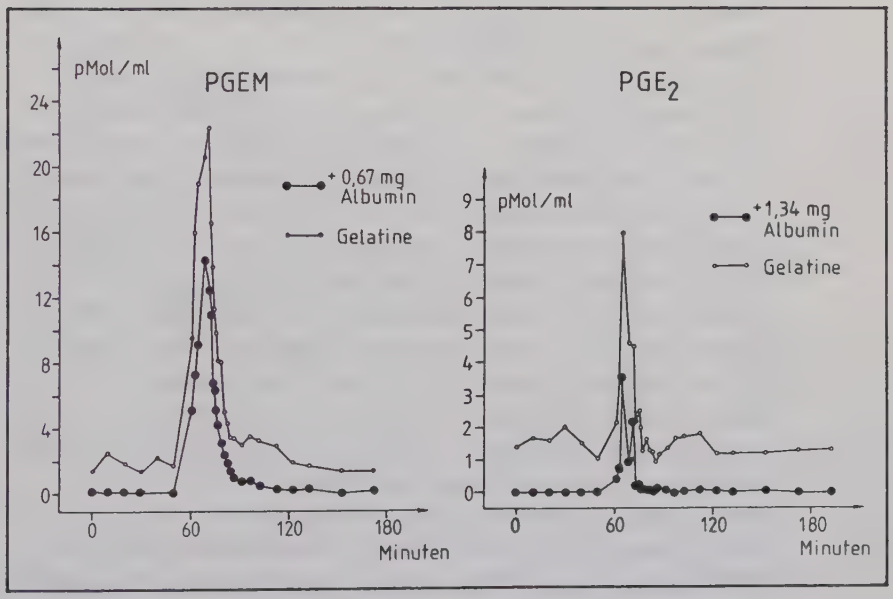
Abb. 11 : Umwandlung von PGEM zu PGAM durch Wärmebehandlung (18 h bei 45°C)
HPLC 58% Methanol/42% Phosphatpuffer pH 7,2
Fraktionierung : 0,4 ml



Die verwendeten E-Antisera werden durch Kreuzreaktion mit im Eluat gelösten unspezifischen Substanzen in ihrer Bindungskapazität und Spezifität stark herabgesetzt und messen bei Verwendung von Gelatinepuffer ohne Zusatz hohe Blindwerte (Abb. 12).

Durch Albuminzusatz von 1,34 mg für PGE_2,bzw. 0,67 mg für PGEM pro Reagenzglas werden diese unspezifischen Substanzen am Albumin gebunden,ohne die Kapazität des Antikörpers zu belasten.Zudem werden sowohl die Bindungsrate,als auch die Sensitivität der Bestimmung (steilerer Eichkurvenverlauf, Abb. 10) verbessert.
Nach Albuminzusatz muß die Aktivkohlebehandlung bei einer Konzentration von 0,4% durchgeführt werden.
Die weitere Behandlung erfolgt analog den F-Prostaglandinen.

Abb. 12 : Auswirkungen von Albuminzusätzen auf die PGE_2 und PGEM Messung (Abb. PGEM Halbwertszeitversuch, Versuchstier "Arche")



b,Radioimmuntest ohne Vorreinigung - Direkttest

Die allgemeinen Aussagen (IIIB2a) über den Radioimmuntest gelten entsprechend.
Die Kartuschenreinigung von Plasmaproben erweist sich bei großer Probenzahl als sehr material- und zeitaufwendig. Es wurde daher versucht,eine Methode zu entwickeln,Plasmaproben bei möglichst geringem Aufwand und gleichzeitig ausreichender Genauigkeit zu entwickeln.Wir versuchten, wie Youssefnejadian et al. (1974),Prostaglandinkonzentrationen direkt,also ohne Vorreinigung des Plasmas, zu bestimmen.Da für eine derartige Methode hochspezifisches Antiserum Voraussetzung ist,wurden nur $PGF_{2\alpha}$ und PGFM untersucht.Aus Vorversuchen ergab sich ein Volumen von 50 μl Plasma als optimal,da bei höherem Plasmaanteil die Eichkurven unempfindlich werden (Abb. 14).
Eichkurven von 4-1000 fMol/50 μl wurden durch Zusätze zu Plasma der hysterektomierten Braunviehkuh "Cloe",das gemäß HPLC Bestimmung endogene Prostaglandinkonzentrationen an $PGF_{2\alpha}$ und PGFM unter 100 fMol/ml aufweist,aufgestellt. Die Verdünnungsreihen wurden dabei in einem Volumen von 5 ml Plasma durchgeführt und anschließend in Portionen von 0,2 ml auf Eppendorf Cups verteilt und bei -20°C gelagert.D.h. 25 praktisch identische Eichkurven,die nur einmal kalibriert werden müssen,stehen zur Verfügung.Den Eichkurven wurde zusätzlich Plasma ohne Zusatz,für GA,NSB,O-Wert (s.o. IIIB2a),und mit definiertem Zusatz ca. 400 fMol PGFM und ca. 700 fMol $PGF_{2\alpha}$,als Kontrollen, ebenfalls in Eppendorfcups beigelegt.
Praktische Durchführung des Direkttests :
50 μl Plasma werden mit 100 μl ^{3}H-markiertem $PGF_{2\alpha}$ bzw. PGFM,jeweils ca. 5000 cpm/100 μl in Gelatinepuffer,und anschließend mit 0,35 ml des jeweiligen Antiserum überschichtet.Nach gründlichem Schütteln erfolgt die Inkubation wie beim RIA nach Vorreinigung.
Nach Behandlung mit 0,4% Aktivkohle wird bei 3000 U/Min., 4°C 10 Minuten zentrifugiert.Der Überstand wird zu 4 ml Rialuma dekantiert,und die Aktivität im Szintillationszähler gemessen.

Abb. 13 : Vergleichende Darstellung des Aufarbeitungs- und Reinigungsganges im RIA mit Vorreinigung und dem Direkttest

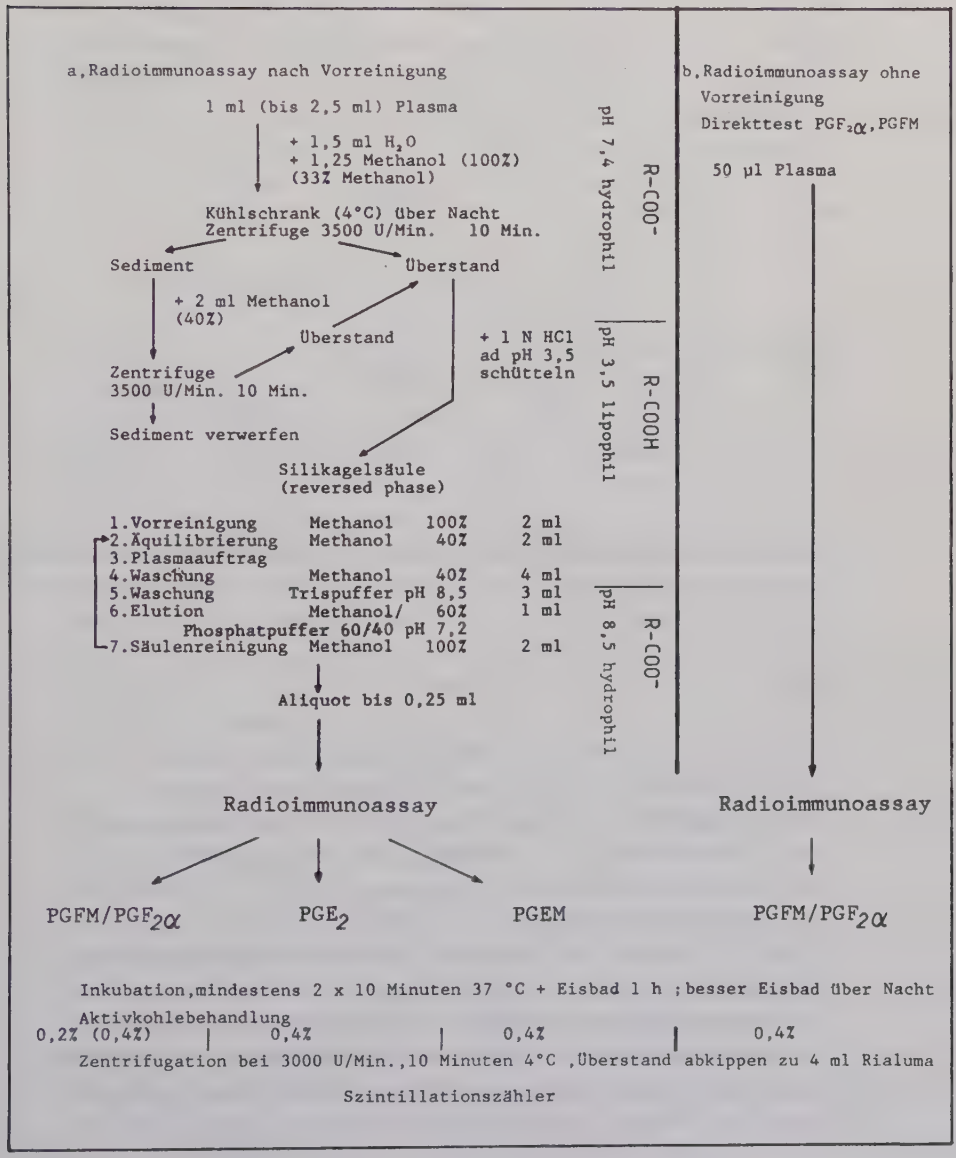
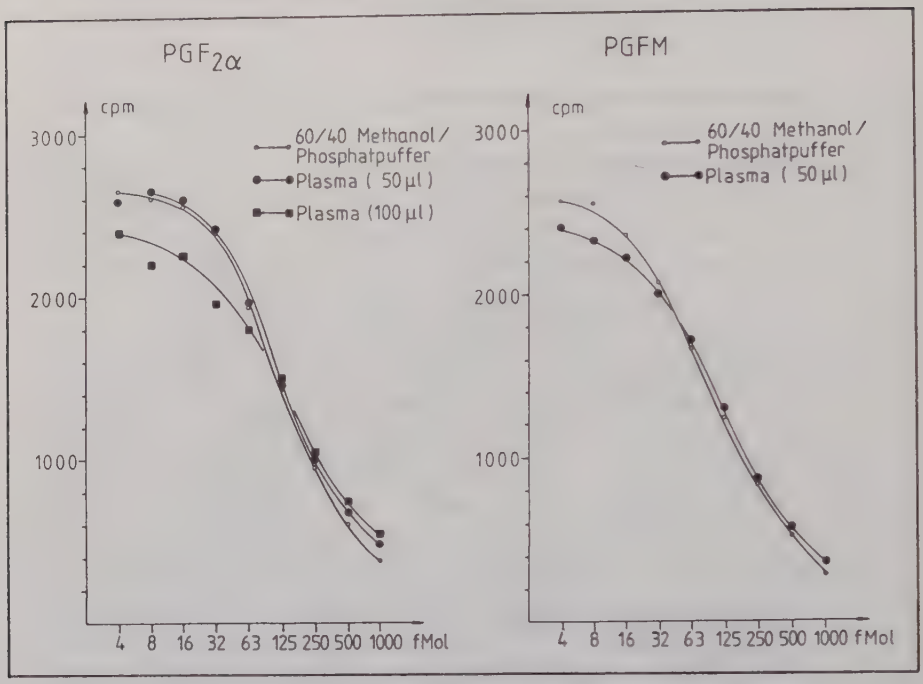


Abb. 14 : Vergleich von $PGF_{2\alpha}$ und PGFM Eichkurven in Plasma und Methanol/Phosphatpuffer 60/40 pH 7,2



3.Kalibrierung der Eichkurven

Bei den Prostaglandinen,insbesondere der E Gruppe, handelt es sich um eine sehr instabile Stoffgruppe. Um eventuellen Falschmessungen durch Abbaureaktionen in den Standardlösungen vorzubeugen,werden regelmäßige Eichkurvenüberprüfungen vorgenommen.
Dem normalen Radioimmuntest werden dafür zwei zusätzliche Nullwerte (je zweifach) zugesetzt,die zweimal,bzw. dreimal mit 0,1 ml des jeweiligen radioaktiv markierten (routinemäßig kartuschengereinigten) Prostaglandins versetzt werden.Die weitere Behandlung erfolgt wie üblich. Die bei diesen 0-Werten gemessene Aktivität wird jedoch

durch 2 bzw. 3 geteilt und die entsprechende Konzentration an der Eichkurve abgelesen.Diese Werte werden mit der Konzentration an Prostaglandin,die mit der Gesamtaktivität zugegeben wurde,verglichen (Berechnung über Zählausbeute, Markierung in Ci/Mol).
Dabei sollte der Wert des doppelten 0-Wertes der Konzentration der mit der Gesamtaktivität zugeführten Prostaglandinmenge,der des dreifachen 0-Wertes dem doppelten dieser Menge entsprechen.Beträgt die Abweichung mehr als 20%,so wird die Standardlösung entsprechend geändert.

4.Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde zur Validierung der Bestimmungsmethode eingesetzt.Die zu untersuchenden Plasmaproben werden über C 18 beschichtete Silikagelsäulen zweifach vorgereinigt,das zweite Eluat (100% Methanol) eingeengt und in 20% Methanol,pH 7,2 oder pH 8,5 (Trispuffer),aufgenommen. Das Auftragsvolumen beträgt 0,5 ml.
Aus der Auftragslösung werden zum Vergleich mit der HPLC-Messung der Fraktionierung entsprechende Aliquots mitbestimmt.Die Auswertung der Fraktionen erfolgt im RIA oder bei tritiummarkierten Proben direkt durch Messung der Aktivität.
Versuchsanordnung :
Säule : Glas Kartusche 150-3,Li chrosorb
150 x 3 mm,5 µm (Merck 685505)
Stationäre Phase : Octadecyl-Silicagel (reversed phase)
Flußgeschwindigkeit : 0,5 ml/Min.
Temperatur : 24,5°C

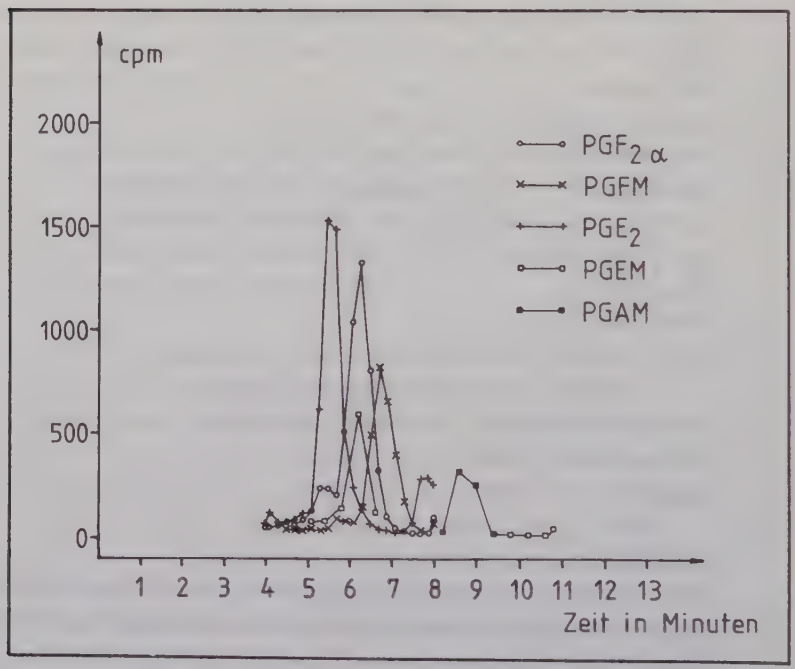
a,Methanolelution
Als mobile Phase dient,falls nicht anders angegeben,ein Gemisch aus 60% Methanol und 40% Phosphatpuffer pH 7,2.
Druck : ca. 115 bar
Die Retentionszeiten der einzelnen Prostaglandine liegen zwischen 5 und 10 Minuten,vom Zeitpunkt des Probenauftrags.

Die Retentionszeit wird vor der Bestimmung einer unbekannten Probe durch Auftragen des betreffenden tritiummarkierten Prostaglandins festgelegt.

Fraktionszeit : 0,2 Minuten;1.Fraktion 4 Minuten;
letzte Fraktion (nach Umschalten auf 100% Methanol) ebenfalls 4 Minuten;
falls nicht anders angegeben.

Mit dieser Anordnung ist keine vollständige Trennung der verschiedenen ^{3}H-markierten Prostaglandine möglich (Abb. 15).Die Bestimmung der einzelnen Prostaglandine erfolgt durch radioimmunologische Auswertung der Fraktionen.

Abb. 15 : Hochleistungsflüssigkeitschromatographische Trennung tritiummarkierter Prostaglandine
Mobile Phase : Methanol/Phosphatpuffer 60/40 pH 7,2 (PGEM,PGAM 58/42)



b,Acetonitrilelution

Mobile Phase : 30% Acetonitril/70% Phosphatpuffer pH 7,2

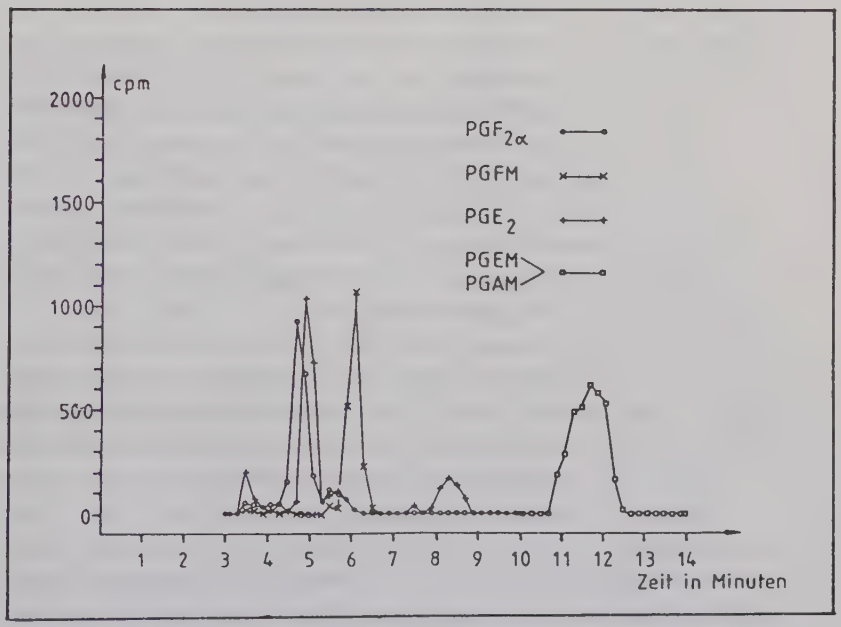
Retentionszeit : zwischen 4 und 12 Minuten

Druck : ca. 90 bar

Fraktionierung wie bei a,

Abbildung 16 zeigt eine klare Trennung der primären Prostaglandine von den betreffenden Metaboliten.Die Trennung der primären Prostaglandine muß jedoch im RIA erfolgen.

Abb. 16 : Trennung tritiummarkierter Prostaglandine mit der HPLC
Mobile Phase : 30% Acetonitril
70% Phosphatpuffer pH 7,2



C,Antikörperproduktion

1.Antigensynthesen

a,$PGF_{2\alpha}$ Antigensynthese

Voraussetzung für die Bestimmung von originärem $PGF_{2\alpha}$ im Radioimmuntest ist das Vorhandensein eines brauchbaren Antikörpers.

Begriffsbestimmung (Rolle und Mayr 1978) :

Antikörper : Ein Antikörper ist ein Agens,das in einem Vertebraten nach entsprechendem Kontakt mit einem Antigen gebildet wird und mit diesem spezifisch reagiert.

Antigen : Antigene sind hochmolekulare organische Verbindungen,die einerseits in der Lage sind, im Wirbeltierorganismus eine Antikörperbildung anzuregen,und zum anderen die Fähigkeit haben,mit den gebildeten Antikörpern spezifisch zu reagieren.Man bezeichnet solche Antigene als Vollantigene oder auch als Immunogene,da sie im Organismus Immunisierungsvorgänge auslösen.

Hapten : Haptene sind niedermolekulare Verbindungen, die nicht zur Antikörperbildung,wohl aber zur Antikörperbindung fähig sind.Derartige Haptene erlangen die Eigenschaften von Vollantigenen,wenn man sie künstlich an hochmolekulare Trägerproteine koppelt.

Das $PGF_{2\alpha}$ Molekül weist bei einem Molekulargewicht von 354,5 Hapteneigenschaften auf.Um als Antigen wirken zu können,muß es also an ein hochmolekulares Protein gebunden werden.Wir verwenden als Trägerprotein Rinderserumalbumin (BSA),als Kopplungsreagenz dient N,N´-Carbonyldiimidazol.

Material : 2,0 mg $PGF_{2\alpha}$
1,1 mg N,N'-Carbonyldiimidazol
0,4 ml Dimethylformamid
1,0 mg BSA in 0,6 ml H_2O bidest.

Methode :
Die Synthese des $PGF_{2\alpha}$-BSA Konjugates erfolgt nach der Methode von Axen (1974),gemäß dem modifizierten Verfahren von Schlegel und Raptis (1976).
2,0 mg $PGF_{2\alpha}$ werden in 2,0 ml 20% Methanol aufgenommen.Um den Ablauf der einzelnen Reaktionsschritte überprüfen zu können werden 10 μl tritiummarkiertes $PGF_{2\alpha}$,mit einer Aktivität von ca. 140000 cpm/10 μl,hinzugefügt.Nach Ansäuern mit 0,2 ml 1 M HCOOH/NaOH pH 3,5 erfolgt eine Kartuschenreinigung;"Waschung" der Säule mit 4 ml 20% Methanol,Elution mit 0,8 ml 100% Methanol in ein Reagiergefäß mit Rührkern. Das Eluat wird im Trockenschrank bei 50°C zu ca. 50% eingeengt und anschließend gefriergetrocknet.Nach Erreichen eines Unterdruckes von ca. 150 Micron werden 1,1 mg N,N'-Carbonyldiimidazol zugewogen und weiter lyophilisiert bis 40 Micron.In das trockene Reagiergefäß werden 0,4 ml Dimethylformamid pipettiert und 20 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt.Während dieser Zeit soll die Kopplungsreaktion des Prostaglandins an das N,N'-Carbonyldiimidazolmolekül,unter Abspaltung einer Imidazolgruppe, ablaufen.N,N'-Carbonyldiimidazol wird in Anwesenheit von H_2O hydrolysiert und damit die Kopplungsreaktion verhindert. Als Reaktionsmedium muß daher eine wasserfreie Flüssigkeit wie das hier verwendete Dimethylformamid dienen.
Nach Zugabe von 1,0 mg BSA in 0,6 ml H_2O bidest. wird weitere 5 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt.Die Kopplung des $PGF_{2\alpha}$-Carbonylimidazol Konjugates an die endständigen Aminogruppen des Lysins am BSA verläuft unter Abspaltung des zweiten Imidazolrestes (Abb. 17).
Die Reaktion wird durch Zugabe von 2,0 ml H_2O gestoppt und das Gemisch in einen Dialysierschlauch mit einem mittleren Porenradius von 24 Angström und einer Durchlässigkeitsgrenze von 8000-15000 Dalton überführt.

Es folgen 6 Stunden Dialyse gegen 250 ml Phosphatpuffer pH 7,2,dann 18 Stunden gegen eiskaltes H_2O bidest.
Das Dialysat wird in ein großes Reagenzglas abgefüllt,der Dialysierschlauch mit H_2O nachgespült und das Volumen mit H_2O bidest. auf ein definiertes Volumen eingestellt.
Die Lagerung erfolgt in Eppendorfcups in Portionen von je 1,0 ml bei -20°C.

Tab. 2 : Ergebnis der $PGF_{2\alpha}$ Antigensynthese

	Aktivität in cpm
Gesamtaktivität	140000
Dialysebad 1	57400
Dialysebad 2	58000
Dialysat	17000

Die Aktivität von 17000 cpm im Dialysat entspricht 12,14% des zugesetzten tritiummarkkierten $PGF_{2\alpha}$,entsprechend 0,243 mg oder 685,5 nMol des unmarkierten Prostaglandins. 1 mg BSA entspricht ca. 14,9 nMol,d.h. es wurden ca. 46 Mole $PGF_{2\alpha}$/Mol BSA gebunden.Da nach Erlanger et al. (1957) nur 60 Aminogruppen am BSA Molekül der Kopplung zur Verfügung stehen,entspricht dieses Ergebnis einer Absättigung von 76,7% .

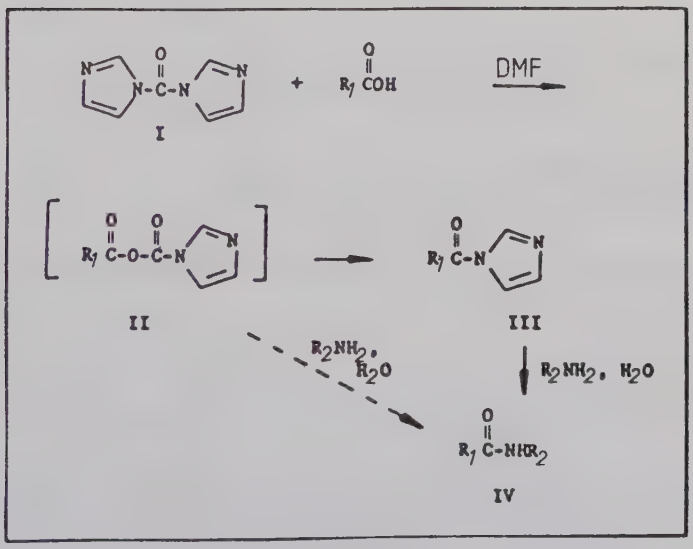
b,PGE_2 Antigensynthese
Die Synthese des Antigens erfolgt analog dem eben geschilderten Verfahren.Die Dialyse wurde dreimal gegen eiskalten Phosphatpuffer pH 7,2 durchgeführt.
Material : 1,0 mg PGE_2
1,5 mg BSA in 0,6 ml H_2O bidest.
0,67 mg N,N´-Carbonyldiimidazol
0,4 ml Dimethylformamid

Tab. 3 : Ergebnis der PGE_2 Antigensynthese

	Aktivität in cpm
Gesamtaktivität	140000
Dialysebad 1	40000
Dialysebad 2	84500
Dialysebad 3	2000
Dialysat	9130

Die Aktivität von 9130 cpm im Dialysat entspricht 6,52% des zugesetzten tritiummarkierten PGE_2,entsprechend 0,0652 mg oder 194,96 nMol des unmarkierten Prostaglandins. Es wurden also 8,276 Mole PGE_2/Mol BSA gebunden,das entspricht einer Absättigung von ca. 13,8% der freien Aminogruppen des BSA-Moleküls.Kindahl erreichte 1978 ähnliche Ergebnisse,meinte jedoch,die Bindungsrate habe weniger Einfluß auf die Immunreaktion.

Abb. 17 : Reaktionsschema der Kopplung von Prostaglandinen an BSA mit Hilfe von N,N'-Carbonyldiimidazol nach Axen (1974)



I, N,N'-Carbonyldiimidazol
II, III, > Zwischenprodukte der Kopplung (ein Imidazolring abgespaltet) : beide reagieren mit Aminen unter Amidbildung
IV, Kopplungsprodukt
DMF Dimethylformamid
R_1 Prostaglandin (lipophiler Zustand)
R_2 Lysingruppe am BSA

2.Immunisierung

a,$PGF_{2\alpha}$
Als Versuchstiere dienen 5 weibliche Kaninchen undefinierbarer Rasse im Alter von ca. 4 Monaten.

Tab. 4 : Immunisierungsschema

Immunisierung	Wochen nach Versuchsbeginn
1	0
2	2
3	6
4	8
5	16

Für jede Immunisierung wird 1 ml des $PGF_{2\alpha}$-BSA Konjugates aufgetaut,mit 1 ml Freund's Adjuvans intensiv vermischt und den Kaninchen beidseits am Rücken intradermal injiziert. D.h. jedes Kaninchen erhält eine Dosis von ca. 20 nMol $PGF_{2\alpha}$,gebunden an ca. 0,43 nMol BSA,in 0,4 ml öliger Suspension.Mit einer feinen Kanüle werden ca. 40 Depots je 0,01 ml gesetzt.Um eine unnötige Belastung der Tiere zu vermeiden,werden sie vor jeder Behandlung mit jeweils 0,4 ml Combelen sediert.
Das Adjuvans dient zur Verstärkung der Immunreaktion.Zur Immunisierung 1 und 2 wird "Freund's complete",danach (Titer meßbar) "Freund's incomplete adjuvans" verwendet.
Aus den Injektionspunkten entwickeln sich Schwellungen bis 0,5 cm Durchmesser,die auch nach Wochen noch palpierbar sind.Im Zentrum dieser Hautschwellungen wird nach einiger Zeit die injizierte Suspension demarkiert und schließlich nach außen abgestoßen.Zurück bleibt eine diffuse Hautverdickung,die lange nachweisbar bleibt,den Tieren aber scheinbar keine Beschwerden bereitet.

b,PGE_2
Als Versuchstiere dienen 10 Kaninchen unbestimmbarer Rasse.
4 männl.,3 kastrierte männl.,3 weibl.
Die Produktion von spezifischen Antikörpern gegen PGE_2

ist mit großen Schwierigkeiten verbunden (Jobke und Peskar 1973,Kopp et al. 1977,Stylos und Rivetz 1972). Das Problem der Instabilität des PGE_2 Moleküls,damit der Bildung von PGA_2,erfordert eine sehr schonende Behandlung des Antigens.Es wird versucht,durch einen möglichst niedrigen Adjuvansanteil die Verweildauer des Immunogens zu verkürzen und damit Umbauvorgänge einzuschränken.
Die Tiere werden in zwei Gruppen geteilt,die eine wird analog der $PGF_{2\alpha}$ Immunisierung intradermal immunisiert,die andere intramuskulär (schnellere Resorption).

Immunisierungsschema :
Gruppe a,intradermal alle 2 Wochen
Gruppe b,intramuskulär alle 2 - 4 Tage
Antigen : Gruppe a,ca. 6 nMol PGE_2 gekoppelt an ca. 0,73 nMol BSA pro Tier,2 ml Lösung + 1 ml Freund´s Adjuvans,d.h. 0,5 ml/Tier

Gruppe b,ca. 1 nMol PGE_2 gekoppelt an ca. 0,12 nMol BSA pro Tier,1 ml Lösung ohne Adjuvans,d.h. 0,25 ml/Tier

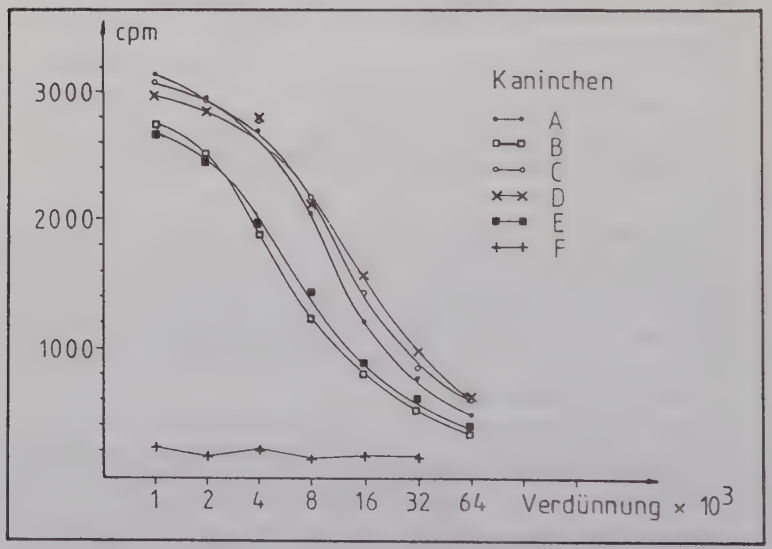
Die Behandlung erfolgte ansonsten analog der $PGF_{2\alpha}$ Immunisierung.

3.Gewinnung und Charakterisierung der Antikörper

a,$PGF_{2\alpha}$ Antikörper
Die Immunreaktion wurde durch regelmäßige Messung des Antikörpertiters überprüft.Den Tieren wurden ca. 2 ml Blut aus der Ohrrandvene oder der zentralen Ohrarterie entnommen und mit 0,1 ml Prostaglandinstabilisator vermischt (Gerinnungshemmung).
Durch Zentrifugation bei 3500 U/Min. wurde das "Antiserum" (eigentlich "Antiplasma") gewonnen.Verdünnungsreihen der einzelnen Antisera (je 0,5 ml) wurden mit 0,1 ml tritiummarkierten $PGF_{2\alpha}$ in Gelatinepuffer (ca. 5000 cpm/0,1 ml) versetzt und das antikörpergebundene ^3H-$PGF_{2\alpha}$ im RIA bestimmt.

Als Titer wurde üblicherweise die Verdünnungsstufe angegeben bei der 50% der eingesetzten Gesamtaktivität gebunden sind. Der Titer stieg bei den einzelnen Kaninchen sehr unterschiedlich.Die Tiere "A" und "C" reagierten am stärksten auf die Immunisierung und der Titer erreichte vier Monate nach der Erstimmunisierung Werte von 1:3000 bzw. 1:4000 (0,5 ml Antiserum) im Pool A-5 bzw. C-5 .
Zwei Wochen nach der fünften Immunisierung wurden Maximaltiter von 1:8000 erreicht (Pool A-F ,Abb. 18).
Die Titer der Tiere "B,D,E" liegen bei ca. 1:4000,das Kontrolltier "F" zeigt,wie erwartet,nur Werte im Bereich der Nicht-spezifischen-Bindung.
Der Versuch der $PGF_{2\alpha}$-Antikörperproduktion wurde ca. 5 Monate nach der ersten Immunisierung abgeschlossen.Den Tieren "A" und "C" wurden,bei gleichzeitiger Infusion von heparinisierter physiologischer Kochsalzlösung,je ca. 100 ml Blut entnommen (Pool A7 bzw. C7),dann wurden alle Versuchstiere euthanasiert.

Abb. 18 : $PGF_{2\alpha}$ Antiserumtiter Pool 6 (A - F)



Da sich bei probeweise durchgeführten Eichkurvenvergleichen der Antiseren A und C eine höhere Sensitivität des Antikörpers A herausstellte,wurde dieser Antikörper (Pool A5) in Hinsicht auf seine Einsatzmöglichkeit genauer untersucht.

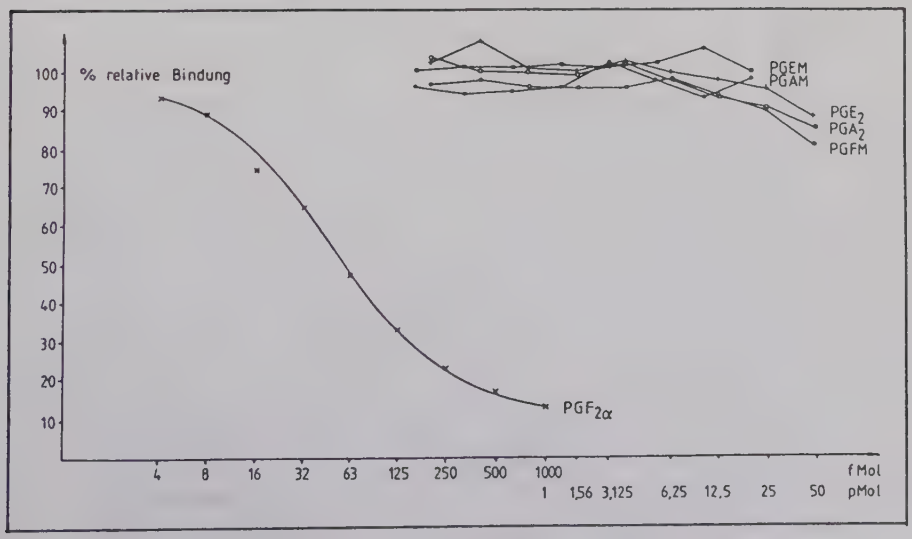
Kreuzreaktion :

Die Kreuzreaktion des "A5" Antiserums wurde gegen folgende Prostaglandine ausgetestet (Abb. 19) :

PGFM : 0,2 - 50 pMol
PGE_2 : 0,2 - 50 pMol
PGA_2 : 0,2 - 50 pMol
PGEM : 0,16- 20 pMol
PGAM : 0,16- 20 pMol

Ergebnis : Der 90 % Wert der relativen Bindung,entsprechend erreicht bei ca. 8 fMol $PGF_{2\alpha}$,wird nur bei Einsatz von 50 pMol PGFM,PGE_2 und PGA_2 unterschritten.50 pMol PGFM verdrängen soviel ^{3}H-$PGF_{2\alpha}$ aus der Antikörperbindung wie 12 fMol $PGF_{2\alpha}$,d.h. bei 90% Bindung liegt die Kreuzreaktion mit diesen Prostaglandinen unter 0,1% .
Das $PGF_{2\alpha}$-Antiserum A5 zeigt demnach praktisch keine Kreuzreaktion mit den untersuchten Substanzen
Die genauen Werte sind Tabelle 21 zu entnehmen.

Abb. 19 : Kreuzreaktion $PGF_{2\alpha}$ Antiserum Pool A-5



Scatchard Plot (Scatchard 1949) :

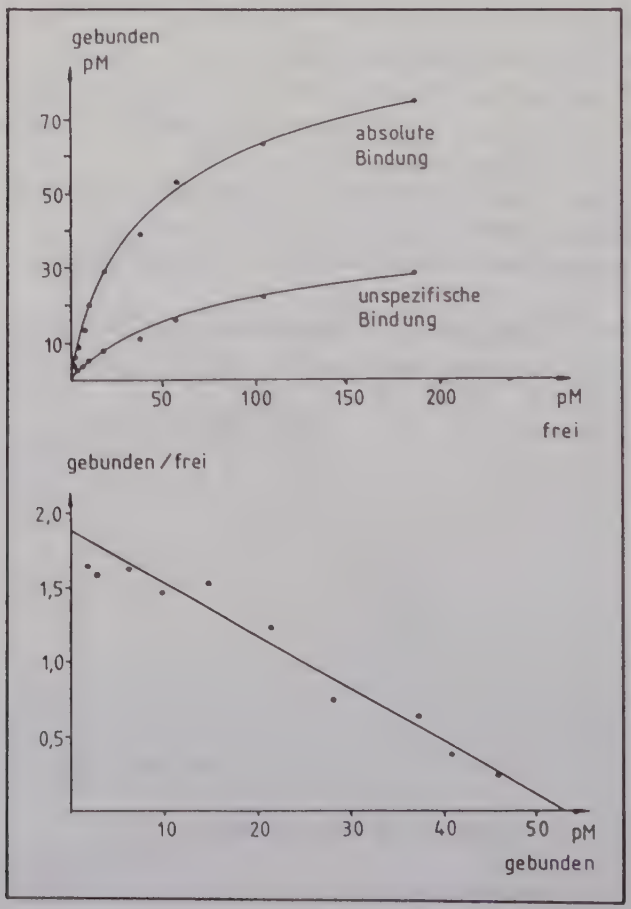
Die Eigenschaften des Antiserums wurden durch Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstante mit Hilfe des Scatchard Plots näher eingegrenzt.

Die ermittelten Werte sind in Tab. 22 und Abb. 20 wiedergegeben.

Berechnung der Regressionsgeraden :

Standardabweichung	: 0,16
Steigung	: - 0,035
Schnittpunkt mit der Y-Achse	: 1,898 ± 0,492
Korr. Koeffizient	: 0,964
Maximale Bindung	: 53,734 pM

Abb. 20 : Scatchard Plot $PGF_{2\alpha}$ Antiserum Pool A-5 (Verdünnung 1 : 4400 in 0,5 ml)



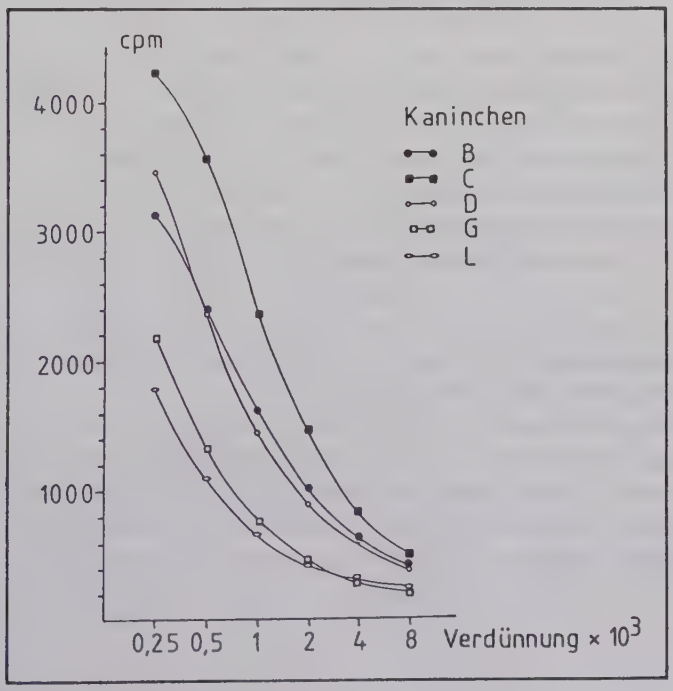
Ergebnis : Assoziationskonst. $K_a = 3,5 \times 10^{10}\ M^{-1}$
Dissoziationskonst. $K_d = 2,8 \times 10^{-11} M$

D.h. bei einer Konzentration von 28 pM $PGF_{2\alpha}$ ist der Antikörper zu 50% gesättigt;er weist demnach eine sehr hohe Affinität zu $PGF_{2\alpha}$ auf.

b.PGE_2 Antikörper

Antikörpertiter waren 3 Wochen nach Erstimmunisierung bei fast allen Tieren meßbar,stiegen jedoch nur sehr langsam und in sehr unterschiedlichem Maße.Fünf Tiere schieden nach 3 Monaten auf Grund ihrer schlechten Immunantwort aus dem Versuch der Antikörperproduktion aus.
Ein Einfluß des Geschlechts der Tiere auf die Antikörperproduktion war nicht feststellbar (Abb. 21).
Die intradermale Immunisierung erbrachte höhere Titer.
Den Antikörpertiter der restlichen fünf Versuchstiere ca. 4 Monate nach Erstimmunisierung zeigt Abb. 21 .

Abb. 21 : Antiserumtiter PGE_2 (in 0,5 ml Endverdünnung) Kaninchen B,C (männl.),D (weibl.) und G (männl. kastriert) wurden intradermal immunisiert, Kaninchen L (weibl.) intramuskulär



Der Titer von maximal 1 : 1000 (Tier "C") ist noch nicht ausreichend für eine genauere Austestung oder den Einsatz im RIA.

D,Validität der Prostaglandinbestimmungen

1."In vitro" Metabolismus

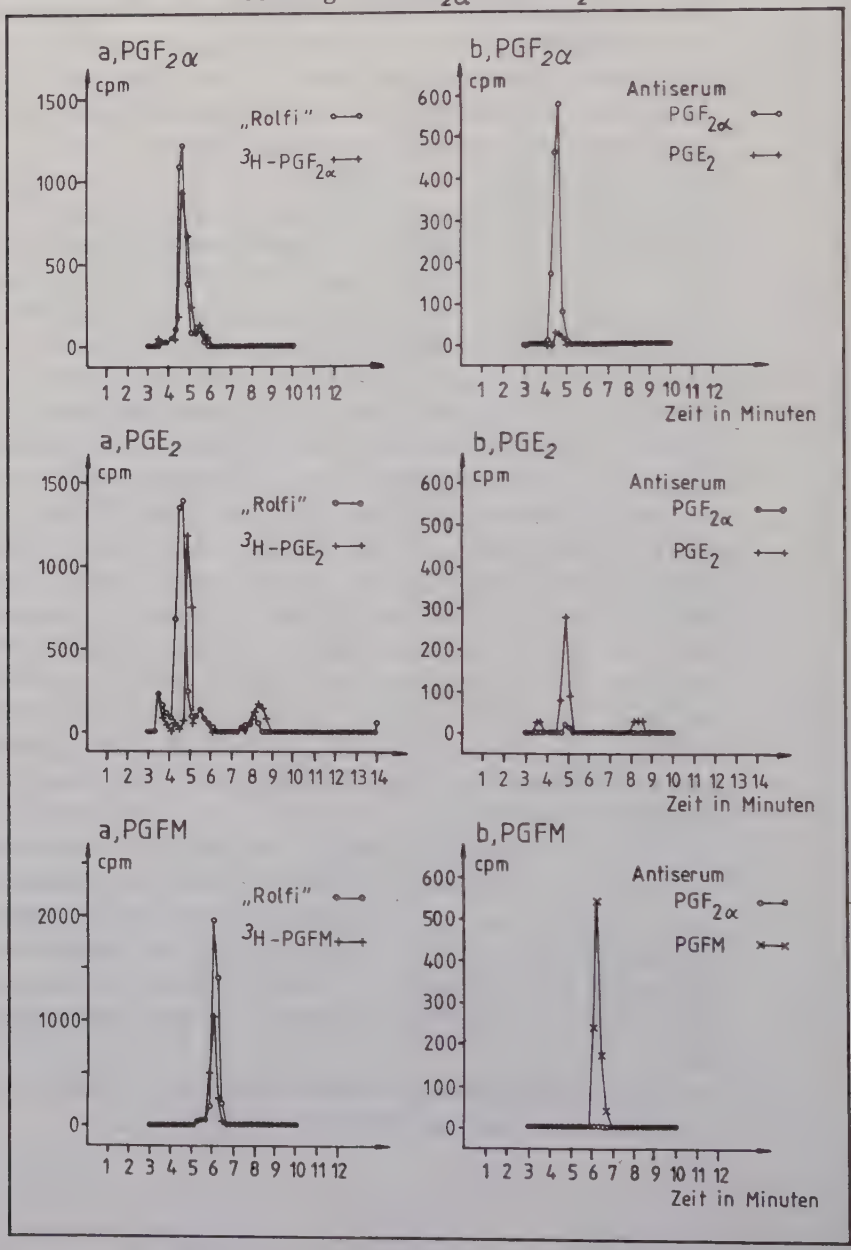
Um die Messung von Prostaglandinkonzentrationen im Blut durchführen zu können,muß verhindert werden,daß durch die Blutentnahme,also iathrogen,die Prostaglandinsynthese angeregt wird und damit hohe endogene Konzentrationen vorgetäuscht werden.
Der Zusatz des Prostaglandinstabilisators soll diese Neusynthese unterbinden.
Den zweiten Risikofaktor der Messung primärer Prostaglandine bildet deren rascher Abbau.D.h. es könnten durch enzymatische Abbauvorgänge in der entnommenen Blutprobe niedrigere Konzentrationen an primären Prostaglandinen,als real vorhanden,vorgetäuscht werden.Die Konzentrationen der Metaboliten im Blut würden dementsprechend überschätzt.
Die Beurteilung der Wirksamkeit des Prostaglandinstabilisators muß sich demgemäß an beiden Kriterien orientieren,der Verhinderung der Neusynthese und des Abbaues.
Routinemäßig werden in 10 ml Blutentnahmespritzen 0,2 ml Prostaglandinstabilisator vorgelegt,d.h. 2 mg Aspirin und 223,4 mg EDTA,entsprechend 10,64 μMol bzw. 60 μMol.
Die Hemmung der Cyclooxigenase durch das zugesetzte Aspirin zeigt die niedrige Basalkonzentration an primären Prostaglandinen,die unter 150 fMol/ml entsprechend 53 pg/ml liegt (mittels HPLC Messung überprüft).
Die Wirksamkeit des zweiten Bestandteils des Prostaglandinstabilisators,des EDTA,beruht auf dessen Fähigkeit Ca- und Mg-Ionen komplex binden zu können.Diese Ionen sind für viele Enzyme (Dehydrogenasen) essentiell,da sie den NAD - NADH + H^+ Zyklus katalysieren (Schrör 1983).

Das zugesetzte EDTA soll also indirekt die Dehydrierung der primären Prostaglandine unterbinden.
Physiologische Blutkonzentrationen (Rind) :

Ca 8,5 - 12 mg/100 ml,d.h. max 30,0 µMol/10 ml Blut
Mg 1,8 - 3 mg/100 ml,d.h. max. 12,3 µMol/10 ml Blut

Das bedeutet,daß bei einer maximalen Blutkonzentration von 42,3 µMol/10 ml,die zugesetzte Menge von 60 µMol EDTA mit einem Sicherheitsfaktor von 1,4 ausreichen sollte,um alle freien Mg- und Ca-Ionen zu binden.Selbst unphysiologische Konzentrationen und Entnahme von mehr als 10 ml Blut sind damit abgedeckt.
Diese Berechnung wurde folgendermaßen abgesichert.
In den Blutentnahmespritzen wurden zusätzlich zum Stabilisator 10 µl tritiummarkiertes Prostaglandin E_2 ,$F_{2\alpha}$ und FM in 100% Methanol mit einer Aktivität von jeweils ca. 100000 cpm/10 µl vorgelegt.Mit diesen Spritzen wurden beim Versuchstier "Rolfi" je ca. 11 ml Blut entnommen und diese Blutproben wie üblich behandelt.
Diese Plasmaproben werden einer zweifachen Kartuschenreinigung als Vorbereitung auf die nachfolgende HPLC Bestimmung unterzogen (IIIB4b Acetonitrilelution).
Diese Anordnung erlaubt eine sichere Trennung der originären Prostaglandine E_2 und $F_{2\alpha}$ von ihren Blutmetaboliten PGEM und PGFM.Die Trennung der beiden primären Prostaglandine wird durch die Aufteilung der Elutionsfraktionen und anschließende Antikörperbehandlung,wie im RIA,erreicht.
Das Eluat mit ^{3}H-PGFM Zusatz wurde ebenfalls verteilt und mit $PGF_{2\alpha}$ und PGFM Antiserum behandelt,um eine mögliche Rückreaktion zum originären Prostaglandin ausschließen zu können (Abb. 22).
Es zeigte sich deutlich,daß bei der von uns routinemäßig durchgeführten Blutprobenbehandlung und -aufarbeitung kein Umbau von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ in ihre 13,14-dihydro-15-keto-Metaboliten "in vitro" stattfindet.Auch der Umbau der originären Prostaglandine in sich,also PGE_2 zu $PGF_{2\alpha}$ und umgekehrt,durch die Prostaglandin-9-Oxidoreduktase,unterbleibt.
Die Konzentrationen von PGFM im Blut bleiben durch unsere Blutprobenaufarbeitung ebenfalls unverändert.

Abb. 22 : "in vitro" Metabolismus,HPLC Acetonitrilelution
Spalte a,Zusatz von ^{3}H-markierten Prostaglandinen zu Blut der Kalbin "Rolfi" im Vergleich zu den entsprechenden ^{3}H-markierten Kontrollösungen
Spalte b,RIA der HPLC Eluate,Behandlung mit verschiedenen Antiseren (insbesondere zur Trennung von $PGF_{2\alpha}$ und PGE_2).



2.Präzision und Nachweisgrenzen des Radioimmuntests

Die Präzision des Radioimmuntest wird durch zwei Faktoren bestimmt.
Der niedrigste Punkt der Eichkurve,bei dem eine relativ sichere Messung möglich ist,hier festgelegt als der 90% Wert der relativen Bindung (0-Wert,d.h. kein Prostaglandinzusatz, = 100%),bestimmt mit dem Aliquotfaktor die Nachweisgrenze (Tab. 5,7).Die Wiederfindung definierter Zusätze gibt die Genauigkeit einer Meßmethode wieder.
Die Wiederfindung tritiummarkierter Zusätze zu Plasma erlaubt eine Beurteilung der Extraktions- und Reinigungsmethode,die Wiederfindung unmarkierter Zusätze der radioimmunologischen Bestimmungsmethode.

a,Radioimmuntest nach Vorreinigung
Die Wiederfindung tritiummarkierter Prostaglandinzusätze zeigt keine Unterschiede bei den vier untersuchten Prostaglandinen.Die durchschnittliche externe Wiederfindung aus 46 Tests ergibt folgendes Bild:

$\bar{x}$ = 87,3 S.D. = 4,4 V.K. = 5,1%

Die Nachweisgrenzen der untersuchten Prostaglandine nach Vorreinigung gibt Tab. 5 wieder.

Tab. 5 : Nachweisgrenzen im RIA nach Vorreinigung

	n Tests	$\bar{x}$ fMol	S.D. fMol	V.K. %	Nachweisgrenze fMol/ml (Faktor 5)
$PGF_{2\alpha}$ Gelatine	18	12,55	3,43	27,3	63
$PGF_{2\alpha}$ + 0,67 mg Albumin/Einzelprobe	5	8,2	1,79	21,8	41
PGFM Gelatine	13	12,23	3,17	25,9	61
PGE_2 + 1,34 mg Albumin/Einzelprobe	6	22,5	7,31	32,3	113
PGEM + 0,67 mg Albumin/Einzelprobe	5	8,41	17,6	47,8	42

Die Wiederfindung definierter unmarkierter Zusätze zu Plasma zeigt Tab. 6 .

Tab. 6 : Wiederfindung unmarkierter Zusätze im RIA nach Vorreinigung

Zusatz fMol/ml	Im RIA bestimmte Konzentration $PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	%	PGFM fMol/ml	%	PGE_2 fMol/ml	%	PGEM fMol/ml	%
2000	-	-	-	-	-	-	2175	108,8
1000	1108	110,8	1287	128,7	916	91,2	1175	117,5
500	545	109,0	647	129,4	413	82,6	520	104,0
250	245	98,0	263	105,2	197	78,8	316	126,4
125	109	87,2	113	90,4	-	-	-	-
63	56	88,8	53	84,1	-	-	-	-
$\bar{x}$		98,8		107,6		84,2		114,2
S.D.		10,99		21,06		6,35		9,88
V.K.		11,13		19,58		7,54		8,65

b,Radioimmuntest ohne Vorreinigung (Direkttest)
Die Nachweisgrenze des Direkttests wird entscheidend von der geringen einsetzbaren Plasmamenge von 50 μl bestimmt. Die im RIA gemessen Konzentration muß also mit dem Faktor 20 auf die Konzentration/ml hochgerechnet werden. Die Nachweisgrenze liegt sowohl für $PGF_{2\alpha}$,als auch für PGFM bei ca. 250 fMol/ml (Tab. 7).

Tab. 7 : Nachweisgrenzen im RIA ohne Vorreinigung

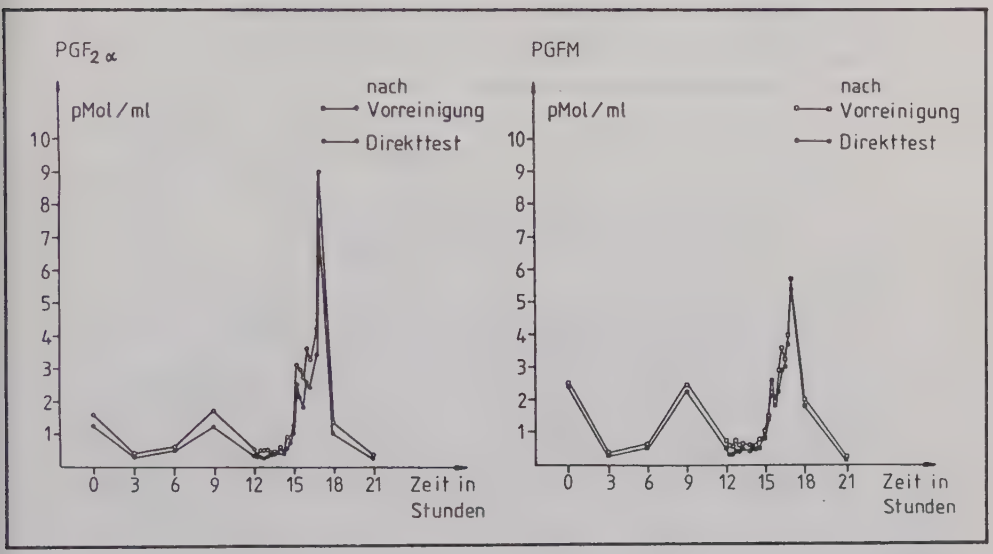
	n (Teste)	$\bar{x}$ fMol	S.D. fMol	V.K. %	Nachweisgrenze fMol/ml
$PGF_{2\alpha}$	17	12,47	3,52	28,2	249
PGFM	10	12,30	2,11	17,2	246

Tab. 8 : Wiederfindung definierter unmarkierter Zusätze im RIA ohne Vorreinigung

Zusatz fMol	Im RIA bestimmte Konzentration $PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	%	PGFM fMol/ml	%
2000	2140	107,0	1760	88,0
1000	1015	101,5	785	78,5
500	493	98,6	469	93,8
250	249	99,6	238	95,2
125	156	124,4	166	132,8
$\bar{x}$		106,22		101,94
S.D.		10,67		16,17
V.K.		10,05		15,86

Zur Validierung des Direkttests wurden Parallelmessungen zum RIA nach Vorreinigung durchgeführt (Eichkurvenverdünnung, Aktivität der ^{3}H-markierten Prostaglandine und Antiserum identisch).

Abb. 23 : Vergleich RIA nach Vorreinigung zu Direkttest $PGF_{2\alpha}$ und PGFM bei Kalbin "Rolfi",Zyklustag 19



Die Abbildungen zeigen sowohl bei $PGF_{2\alpha}$,als auch bei PGFM einen annähernd parallelen Verlauf der Meßergebnisse.Die im Direkttest gemessenen Werte liegen durchweg etwas niedriger.Der Grund dafür ist die Prostaglandinkonzentration des zur Eichkurve verwendeten Plasmas.Im Direkttest wird diese Konzentration gleich Null gesetzt.Der reale Wert wird also von jeder unbekannten Probe abgezogen.Zudem werden die Plasmakonzentrationen im RIA nach Vorreinigung besonders im Bereich unter 300 fMol/ml überschätzt (Tab. 13). Die Meßwerte der Paralleltests wurden einander gegenübergestellt (Abszisse Direkttest,Ordinate nach Vorreinigung) und die Regressionsgerade berechnet.

Tab. 9 : Regressionsgerade gebildet aus den Plasmakonzentrationen im Direkttest (Abszisse) und im RIA nach Vorreinigung (Ordinate)

	PGFM	$PGF_{2\alpha}$
n	25	25
Steigung	0,926	0,784
Schnittpunkt mit der Y-Achse	-94,3	-37,8
Korr. Koeff.	0,990	0,998

Geradengleichung : $y = a + bx$

y = Konzentration im Direkttest

a = Schnittpunkt der y-Achse,d.h. im Direkttest gemessene Konzentration beim 0-Wert des RIA nach Vorreinigung

b = Steigung der Geraden,b = 1 bedeutet gleiche Konzentration in beiden Bestimmungsmethoden.

x = Konzentration im RIA nach Vorreinigung

Die Abweichung der Meßergebnisse von der idealen Geraden ist sehr klein (Korrelations Koeffizient !).D.h. die Korrelation beider Methoden ist sehr eng.Der Direkttest unterschätzt die im RIA nach Vorreinigung ermittelten Werte um einen Faktor 0,9 (PGFM) bzw. 0,8 ($PGF_{2\alpha}$).Außerdem wird eine Konstante von 94 fMol/ml bzw. 38 fMol/ml abgezogen.

3.Reproduzierbarkeit

Die Bestimmung von Plasmaproben mit definierten Zusätzen bei jeder durchgeführten Prostaglandinbestimmung liefert erstens einen raschen Überblick über Erfolg oder Mißerfolg der betreffenden Bestimmung.
Zweitens kann durch exakten Vergleich der Meßergebnisse der Zusätze im Test selbst (Intraassayvariation) und zwischen verschiedenen Tests (Interassayvariation) die Reproduzierbarkeit der Methode bestimmt werden.

a,RIA nach Vorreinigung

Tab. 10 : Reproduzierbarkeit der Messungen nach Vorreinigung

	Konzentration fMol/ml	Interassayvariation n	S.D. fMol/ml	V.K. %	Intraassayvar. n	$\bar{x}$ %
$PGF_{2\alpha}$	807	25	110,1	13,64	8	8,35
PGFM	261	8	50,3	19,28		
	995	24	126,1	12,67	8	8,31
	3437	8	315,0	9,16		

Die Messung von PGE_2 und PGEM war im Rahmen der vorliegenden Versuche erst in der Endphase möglich.Daher liegen noch zu wenig Daten vor,um Aussagen über die Reproduzierbarkeit machen zu können.Über die entsprechenden Versuche wird an anderer Stelle berichtet (Diss. med. vet. H.Feck in Vorbereitung).

b,Direkttest

Tab. 11 : Reproduzierbarkeit der Messungen im Direkttest

	Konzentration fMol/ml	Interassayvariation n	S.D. fMol/ml	V.K. %	Intraassayvariation n	$\bar{x}$ %
$PGF_{2\alpha}$	698,6	53	126,37	18,1	14	9,22
PGFM	360,4	30	64,11	17,8	8	12,74

Der Direkttest wurde in Einzelbestimmung durchgeführt.Dies beeinflußte die Reproduzierbarkeit deutlich negativ.Da die im Doppelansatz durchgeführte Mittelwertbildung von zwei Meßwerten die Varianz der Ergebnisse vermindert,kann davon ausgegangen werden,daß die Reproduzierbarkeit des Direkttests in Doppelbestimmung der des RIA nach Vorreinigung zumindest entspräche.

4.Spezifität der Messungen

a,Antiserum

Die Spezifität einer Bestimmungsmethode wird von der Qualität des verwendeten Antiserums geprägt.

$PGF_{2\alpha}$: Im Kapitel IV,A wurde gezeigt,daß der verwendete Antikörper A-5 keine Kreuzreaktion und eine sehr hohe Affinität zeigt.Das Antiserum wurde in einer Endverdünnung von 1 : 6000 (0,5 ml) verwendet.

PGFM,PGE_2,PGEM : Diese Antisera wurden von W.Schlegel (Münster) zur Verfügung gestellt und hier nicht näher untersucht.Nach Angaben von W.Schlegel zeigt der PGFM Antikörper keine Kreuzreaktion,dies wurde durch die folgenden HPLC Messungen bestätigt.
Der PGE_2 Antikörper reagiert zu 100% mit PGA_2 kreuz,ebenso der PGEM Antikörper mit PGAM.
Diese Antiseren wurden in folgender Endverdünnung (0,5 ml) eingesetzt :

PGFM	1 : 30000
PGE_2	1 : 6000
PGEM	1 : 23000

b,Parallelität

Ein weiterer Parameter für die Spezifität eines Meßsystems ist die Parallelität der Messungen.D.h. bei Einsatz verschiedener Plasma- bzw. Eluatvolumina in den RIA wird die gleiche Konzentration errechnet.Falls unspezifische Substanzen im RIA erfaßt würden,würde sich durch Ausverdünnung bei geringeren Plasmavolumina eine niedrigere Prostaglandinkonzentration als bei größerem Volumen ergeben.

Tab. 12 : Parallelität der Prostaglandinbestimmung (nach Vorreinigung)

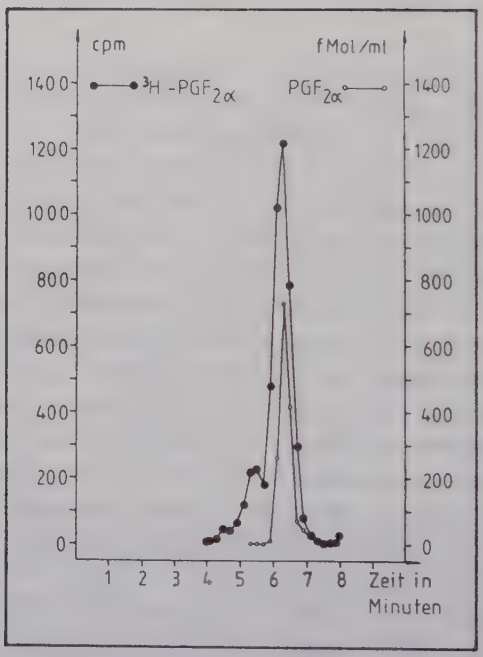
Volumen in µl	$PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	PGFM fMol/ml	PGE_2 fMol/ml	PGEM fMol/ml
200	2323	2887	4218	2494
180	2359	2660	4160	2692
150	2263	2726	4270	2608
120	2249	2775	4104	2422
100	2217	2818	4324	2776
80	2270	2610	4121	2740
50	2306	2676	4211	2579
40	2252	2606	4136	2211
20	1932	2673	3638	3400
$\bar{x}$	2241	2715	4151	2658
S.D.	123,7	95,6	198,5	328,5
V.K.(%)	5,5	3,5	4,8	12,4

Die ermittelten Abweichungen liegen bei ca. 5% .
Die Abweichung von 12% bei PGEM spiegelt mangelnde Präzision wieder.

c,Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Mittels Methanolelution und anschließendem RIA wurde die Spezifität der Messungen überprüft.
Der Vergleich von direkt aus der Auftragslösung bestimmten Aliquots und der im Eluat am "Peak" gemessenen Prostaglandinkonzentration ergibt den Anteil der spezifischen Bindung in Prozent (= Wiederfindung bei der HPLC).
D.h. die nach HPLC gemessene Konzentration gibt den realen Wert der Prostaglandinkonzentration in einer Probe an.Die Differenz zu der direkt im RIA ermittelten Vergleichsprobe zeigt den Anteil der unspezifischen Bindung.
Diese Auswertung zeigte bei PGE_2 und PGEM bei Verwendung allein von Gelatinepuffer im RIA eine spezifische Bindung von ca. 10% ;d.h. diese Antikörper reagieren kreuz mit einer nicht näher zu definierenden Substanz im Eluat.Durch Zusatz von Albumin (1,34 bzw. 0,67 mg/0,5 ml Endverdünnung verschwanden die hohen Blindwerte (Abb. 12).Die Wiederfindung bei HPLC Messung stieg auf annehmbare Werte.

$PGF_{2\alpha}$ und PGFM Messungen im RIA werden durch die HPLC ab einem Bereich von 500 fMol/ml zu über 90% bestätigt.Unter 300 fMol/ml liegt die reale Prostaglandinkonzentration bei ca. 55% (Tab. 13).
Die im RIA ermittelten PGE_2 und Konzentrationen über 500 fMol/ml werden mittels der HPLC zu 70% bestätigt.
Die Wiederfindung tritiummarkierter Prostaglandinlösungen beträgt bei der verwendeten Anordnung (III,B,4a) ca. 90%. Entsprechend wurden die in den Eluaten gefundenen Konzentrationen korrigiert.
Ein typisches Bild einer erfolgreichen Prostaglandinbestimmung mittels der HPLC gibt Abb. 24 wieder.

Abb. 24 : Bestimmung der $PGF_{2\alpha}$ Konzentrationen im Plasma bei der Kuh "Fee" (Tag 2 p.p.) nach Festlegung der Retentionszeit von ^3H-$PGF_{2\alpha}$ mittels der HPLC (Vena cava caudalis)



Tab. 13 : Überprüfung der Spezifität der Prostaglandinmessung mittels der HPLC

	Konzentrationsbereich fMol/ml	HPLC Messung/direkt RIA n	$\bar{x}$(%)	S.D.	V.K.
$PGF_{2\alpha}$	unter 300	8	53,4	10,87	20,17
	über 500	3	91,5	9,22	10,08
PGFM	unter 300	5	56,4	14,66	25,97
	über 500	2	96,3	1,20	1,25
PGE_2	über 500	2	73,6	5,30	7,20
PGEM	über 500	2	72,6	4,88	6,72

E,Weitere hormonanalytische Verfahren

Die in vorliegender Arbeit bei den Rinderversuchen angegebenen Werte für Progesteron,Ocytocin,Östradiol und LH wurden im Rahmen einer Teamarbeit des Instituts erstellt. Sie werden hier zu Vergleichszwecken für die physiologischen Aussagen verwendet.
Zugrunde liegen radioimmunologische Bestimmungsmethoden,wie sie für Progesteron von Hoffmann et al. 1973,für Ocytocin von Schams et al. 1979 und Schams 1983,für LH von Schams und Karg 1969,sowie für Östradiol von Walters und Schallenberger 1983 beschrieben wurden.

F,Tierexperimente

1.Operation,Blutprobengewinnung,-behandlung,-lagerung

Die Operation wurde von Dr. E.Schallenberger nach der von Walters und Schallenberger 1982 beschriebenen Methode durchgeführt.
Hier eine kurze Operationsdarstellung :
Nach Sedation des Tieres mit Combelen,wird die Schwanzunterseite und die Kruppe rasiert und desinfiziert.Zur Schmerzausschaltung und Immobilisation des Operationsgebiets wird eine extradurale Anästhesie mit 2% Ultracain durchgeführt,. Der Schwanz wird daraufhin maximal nach oben gebogen,um das Operationsgebiet zugänglich zu machen.Nach einem Hautschnitt von ca. 5 cm Länge median in der Schwanzunterseite unter dem vierten bis fünften Schwanzwirbel wird vorsichtig in die Tiefe präpariert und eine größere Vene freigelegt. Diese Vene wird eröffnet und ein Polyvinylkatheter von 2 mm Außendurchmesser bis auf die nach Größe des Tieres gemäß früheren Untersuchungen erforderliche Länge eingeschoben.Der Katheter wird an der Vene befestigt und seine Lage durch mehrere Hefte im Bindegewebe fixiert.Nun wird eine Kruppe örtlich betäubt und der Katheter subcutan bis in diese Kruppengegend vorgeschoben.Hier befindet sich die Austrittsstelle.Das freie Katheterende wird in einem durch zwei Hauthefte befestigten Ledertäschchen aufbewahrt.
Das Einsetzen eines Aorta abd. Katheters erfolgt genauso.
Die Tiere werden die nächsten Tage unter genauere Beobachtung gestellt und mit therapeutischen Dosen von Tardomyocel und Chloramphenicol versorgt,da im Versuchstierstall (Veitshof) mit Hospitalismus,insbesondere Pseudomonas aeruginosa und Corynebacterium pyogenes,zu rechnen ist.
Die Kontrolle der Katheterposition wird mit Hilfe eines Vergleichs der Progesteronkonzentrationen in Blutproben aus den gelegten Kathetern mit gleichzeitig aus der Vena jugularis entnommenen Proben durchgeführt.

Entscheidend ist die Lage der Kathetermündung zur Einmündungsstelle der Ovarvene.Liegt sie caudal der Vene,ergibt sich ein Verhältnis von ca. 1:1,liegt sie dagegen cranial,so wird das Verhältnis um so kleiner,je größer die Entfernung der beiden ist.
Als Beispiel soll folgender an der Kalbin "Rolfi" durchgeführte Versuch dienen.Hier wurden Progesteronvergleichsmessungen bei verschiedenen Kathederpositionen zur Vena jugularis Konzentration durchgeführt.

Tab. 14 : Vergleich der Progesteronkonzentrationen in Vena cava caudalis und Vena jugularis

Katheterlänge	Progesteron ng/ml vena cava	v.jugularis	Verhältnis
100 cm	12,0	9,6	1,25 : 1
90 cm	18,7		1,95 : 1
80 cm	22,6		2,35 : 1
70 cm	58,7		6,11 : 1
65 cm	86,6		9,02 : 1

Um Blutgerinnung in den Kathetern zu unterbinden,werden sie mit heparinisierter physiologischer Kochsalzlösung gefüllt (während frequenter Blutentnahme 200 I.E Heparin/250 ml,sonst 500 I.E/250 ml).
Bei allen Manipulationen am Tier wird Wert auf größtmögliche Sauberkeit und Hygiene (Desinfektion der Hände vor einer Blutentnahme,sterile Abdecktücher,Desinfektion der Täschchen usw.) gelegt.

Blutprobennahme,-behandlung :
In 10 ml Einmalspritzen werden 0,2 ml Prostaglandinstabilisator vorgelegt.Es werden maximal 11 ml Blut über den Katheter angezogen und in heparinisierte Blutentnahmeröhrchen abgefüllt.Diese werden nach vorsichtigem Schwenken im Eisbad 5 - 10 Minuten gekühlt,um Enzymreaktionen,die der Stabilisator eventuell nicht unterbindet,zu hemmen. Danach wird in einer Kühlzentrifuge bei 3000 U/Min.,4°C 20 Minuten zentrifugiert,das überstehende Plasma abgehebert, verteilt und bei -20°C gelagert.

2.Halbwertszeitversuche

a,1.PGFM Halbwertszeitversuch

Als Versuchstier diente die Braunviehkuh "Cloe",die nach Hysterektomie,damit der Entfernung des Hauptortes der Prostaglandinsynthese im Reproduktionstrakt,nur noch sehr niedrige PGFM Plasmawerte aufwies und dadurch geradezu ideale Voraussetzungen für die Durchführung des Halbwertszeitversuches bot.

Über einen Vena cava caud. Katheter wurden mittels einer Peristaltikpumpe 9,32 mg,entsprechend 26,29 μMol $PGF_{2\alpha}$, gelöst in 233 ml 0,9% NaCl Lösung,innerhalb von 30 Minuten infundiert.Das entspricht einer Zufuhr von 0,311 mg, entsprechend 877,2 nMol $PGF_{2\alpha}$/Minute.

Die Blutentnahme erfolgte über einen Aorta abd. Katheter.

Die Versuchsdurchführung gliedert sich in drei Abschnitte:

1. 0 - 30 Min. : Kontrollperiode
2. 30 - 60 Min. : Infusion
3. 60 - 190 Min. : Halbwertszeitmessung

Die Blutentnahmefrequenz ist Tab. 24 zu entnehmen.

Die Versuchsanordnung lehnt sich eng an die physiologischen Gegebenheiten an : Prostaglandinproduktion im Uterus,evtl. Ovar,Abgabe via Uterus- und Ovarvenen in die Vena cava caudalis und über die Lunge wieder in den Kreislauf.

b,2.PGFM Halbwertszeitversuch

Gegenüber dem ersten Halbwertszeitversuch wurde folgendes abgeändert :

Infusion in rechte Vena jugularis

Blutentnahme aus linker Vena jugularis (Frequenz in Tab. 25)

Infusionsmenge : 0,173 mg,entsprechend 454,7 nMol,$PGF_{2\alpha}$ d.h. 15,16 nMol/Min.

c,PGEM Halbwertszeitversuch

Analog wurde versucht,die PGEM Halbwertszeit zu bestimmen, um damit die Verwendungsmöglichkeit dieses Metaboliten als Marker für die Produktion des primären PGE_2 abschätzen zu können.Die Vorbemerkungen zum PGFM Halbwertszeitversuch gelten entsprechend (Tab. 26).

Als Versuchstier diente die Braunviehkalbin "Arche".Infundiert wurde über einen Vena cava caud. Katheter,die Blutentnahme erfolgte aus einem Aorta abd. Katheter.
Es wurden 1,08 mg PGE_2,entsprechend 3,065 μMol,in 63 ml 0,9% NaCl Lösung innerhalb von 11,5 Minuten mittels einer Peristaltikpumpe infundiert.

3.Prostaglandinfreisetzung im physiologischen Zyklus

Versuchstiere : 5 Braunviehkalbinnen im Alter von ca. 16 Monaten,Gewicht ca. 450 kg,mit regulärem Zyklus

Tab. 15 : Brunstdaten

Kalbin	Zykluslänge vor Blutentnahme			während + nach Blutentnahme		
	n	$\bar{x}$	S.D.	n	$\bar{x}$	S.D.
"Resana"	4	22,0	1,15	2	21,5	0,41
"Rolfi"	3	20,3	0,41	2	20,5	0,41
"Burgl"	4	21,8	2,22	2	19,5	0,41

Die Tiere "Rolfi" und "Gams" wurden mittels Prostaglandinanaloginjektion zu den drei anderen Kalbinnen synchronisiert. Als Versuchsbeginn wurde der jeweils 8.Tag des Zyklus angesetzt (Vena cava Katheter).Die Operation scheiterte bei den Tieren "Gams" und "Rinka".

Tab. 16 : Katheterlängen

"Resana"	65 cm
"Rolfi"	65 cm
"Burgl"	70 cm

Der Katheter der Kalbin "Burgl" wurde am Zyklustag 15 um 5 cm zurückgezogen,da Rückflußstörungen aufgetreten waren. Die Operation wurde von allen Tieren ohne Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens überstanden.Gegen Ende des Zyklus traten bei allen drei Tieren kurzzeitige Fieberschübe auf, die durch Antibiotikabehandlung (Tardomyocel,Chloramphenicol) jedoch rasch unter Kontrolle gebracht wurden.

Blutentnahme :
Frequente Blutentnahme (viertelstündlich,5 Stunden lang) an den Zyklustagen 12,14,15,16,17,18,19,20,21=0,3,6,9
3-stündige Blutentnahme ab Tag 11 bis Tag 8 des nächsten Zyklus (Blutentnahme 3-6-9-12-15-18-21-24 Uhr).
Gesamtblutverlust : Frequ. 12 x 21 x 11 = ca. 2,8 l
3-stündig 144 x 11 = ca. 1,4 l
Operation + zus. Verluste 0,8 l
gesamt ca. 5 l
Der Verlust dieser Blutmenge innerhalb von 3 Wochen wurde von allen Tieren,bis auf einen leichten Gewichtsverlust, gut ertragen.
Versuchstierstall "Veitshof",Fütterung : Maissilage,Heu, Anbindehaltung

4.Behandlung von Kalbinnen mit Ocytocinantikörpern

Durch Behandlung von Kalbinnen mit Ocytocinantikörpern soll die Frage nach dem Auslöser der Prostaglandinfreisetzung im Zyklus geklärt werden.
Versuchstiere : 8 Braunviehkalbinnen,Alter ca. 16 Monate, Gewicht ca. 450 kg,mit regelmäßigem Zyklus
2 Tiere mittels Prostaglandinanaloginjektion synchronisiert.
Operation : Tag der Brunst,es werden Vena cava caudalis und Aorta abdominalis Katheter gelegt.
Die Operation konnte nur bei 5 Tieren erfolgreich abgeschlossen werden.
Katheterlänge : Jeweils 63 cm
Aortakatheter bei "Kuni" 30 cm
Jeweils vier Tiere werden über Aorta- bzw. Vena jugularis-katheter mit der untenstehenden Antikörperlösung oder mit auf diesselbe Weise aufbereitetem Schafplasma (Kontrolltiere) behandelt.
Behandlungsschema : Zyklustag 0,3,6,9,12,15,18

Blutentnahme : Jeweils morgens und abends eine Blutprobe aus Aorta und Vena cava caud.,um die Katheterposition zu kontrollieren.
Frequente Entnahme (viertelstündlich, 8 Stunden lang) an den Zyklustagen 2,4,6,8,10,12,14,15,16,17,18,19,20,21 aus der Vena cava.
Zusätzlich frequente Entnahmen jeweils an den Behandlungstagen über Vena jugularis Katheter (erfolglos operierte Tiere) oder Aorta Katheter.Blutentnahme 2,5 Stunden lang,ebenfalls viertelstündlich.

Antiserum : Ocytocinantiserum von Schafen
Die Antikörper wurden durch Cohn Fällung (IgG in Cohn Fraktion 2) konzentriert und von einem Teil der Plasmaproteine befreit. Nach Lyophilisation werden definierte Mengen abgewogen,die zur Behandlung in physiologische Kochsalzlösung aufgenommen werden.

Berechnung der erforderlichen Menge :
In der Vena jugularis werden max. 4 ng Ocytocin/l Plasma gemessen.Bei einer geschätzten Plasmamenge von 25 l/Tier ergibt das eine zirkulierende Gesamtmenge von maximal 100 ng Ocytocin.Bei einer Halbwertszeit von 30 Minuten ergibt sich eine Tagessekretion von 4,8 µg Ocytocin,bei einem Sicherheitsfaktor 3 demgemäß 14,4 µg.
1 ml Antiserum = 60 mg Präzipitat neutralisiert 690 ng Ocytocin "in vitro".D.h. es sind ca. 20,9 ml Antiserum, oder 1,252 g Präzipitat nötig,um 14,4 µg Ocytocin zu neutralisieren,bei 3-tägiger Behandlung also 3,76 g Präzipitat (Lebensdauer von Antikörpern ca. 10 Tage).
Kontrollplasma (Schafplasma) : jeweils 60 ml werden in gleicher Weise,wie das Antiserum behandelt.Bei einer Menge von 31,7 mg Präzipitat/ml Plasma ergibt sich eine Behandlungsdosis von 1,9 g/Tier.

5.Ocytocininjektionen bei Kalbinnen

Versuchstiere : 2 Fleckviehkalbinnen,Alter ca. 18 Monate, Gewicht ca. 450 kg,mit regulärem Zyklus ("Arche" und "Lunte")
Operation am Zyklustag 5 : Katheter in Vena cava caudalis und Aorta abdominalis,Länge jeweils 62 cm
Versuchsdurchführung :
An den Zyklustagen 6,13,16 bzw. 17 werden via Aortakatheter jeweils drei Injektionen von je 1 I.E. Ocytocin,gelöst in 10 ml physiologischer NaCl,verabreicht (Zyklustag 18 nur eine Injektion).Blutentnahme aus Vena cava caud. (Frequenz aus Tab. 29 zu entnehmen).
Bei der Kalbin "Arche" konnten am Zyklustag 12 keine Blutproben gezogen werden (Katheter nicht durchgängig).

IV,Ergebnisse der Versuche am Rind

A,Prostaglandinhalbwertszeitbestimmungen

1.Bestimmung der PGFM Halbwertszeit
Die Auswertung der Plasmaproben erfolgte mittels des RIA nach Vorreinigung.Zusätzlich zu den PGFM Konzentrationen wurden auch $PGF_{2\alpha}$,Progesteron und Ocytocin in den Plasmaproben bestimmt.

a,Versuch I (Infusion von 9,32 mg $PGF_{2\alpha}$)

PGFM
Die Konzentration an PGFM stieg während der Infusion von einem Basalniveau von ca. 150 fMol/ml sehr rasch an und erreichte Maximalwerte von über 50 pMol/ml Plasma.

Nach Infusionsende fiel die PGFM Konzentration in den ersten Minuten sehr rasch ab.Dieser Abfall verlangsamte sich allmählich,das Basalniveau wurde nach ca. 90 Minuten wieder erreicht (Abb. 25,Tab. 24).
Die Darstellung der logarithmierten Konzentrationswerte gegen die Zeit ergab einen nichtlinearen Verlauf, d.h. die Halbwertszeitbestimmung ergab kein einheitliches Ergebnis.
Mit Hilfe der Berechnung der Steigung der Regressionsgeraden, gebildet aus den logarithmierten Werten und der Zeit, wurden folgende Halbwertszeiten errechnet :

0 - 5	Minuten	nach	Infusionsende	2,2 Minuten
5 - 15	"	"	"	6 Minuten
über 15	"	"	"	15 Minuten

Eine Klärung dieses Phänomens wurde durch Infusion einer geringeren Dosis $PGF_{2\alpha}$ angestrebt.

$PGF_{2\alpha}$

Im ersten PGFM Halbwertszeitversuch wurde auch die $PGF_{2\alpha}$ Konzentration im Plasma bestimmt (Direkttest).Von einem Basalniveau von ca. 100 fMol/ml ausgehend wurden während der Infusion über 6 pMol/ml erreicht.Dieser Wert entspricht 10% der erreichten PGFM Konzentration;90% des infundierten $PGF_{2\alpha}$ wurden folglich in der Lunge zu PGFM umgebaut.
Die $PGF_{2\alpha}$ Konzentration ist 1 Minute nach Infusionsende fast wieder auf das Basalniveau abgesunken (Abb. 26,Tab. 24), d.h. die $PGF_{2\alpha}$ Konzentration im Plasma von ca. 6 pMol/ml wurde während einer Minute fast vollständig metabolisiert.

Ocytocin

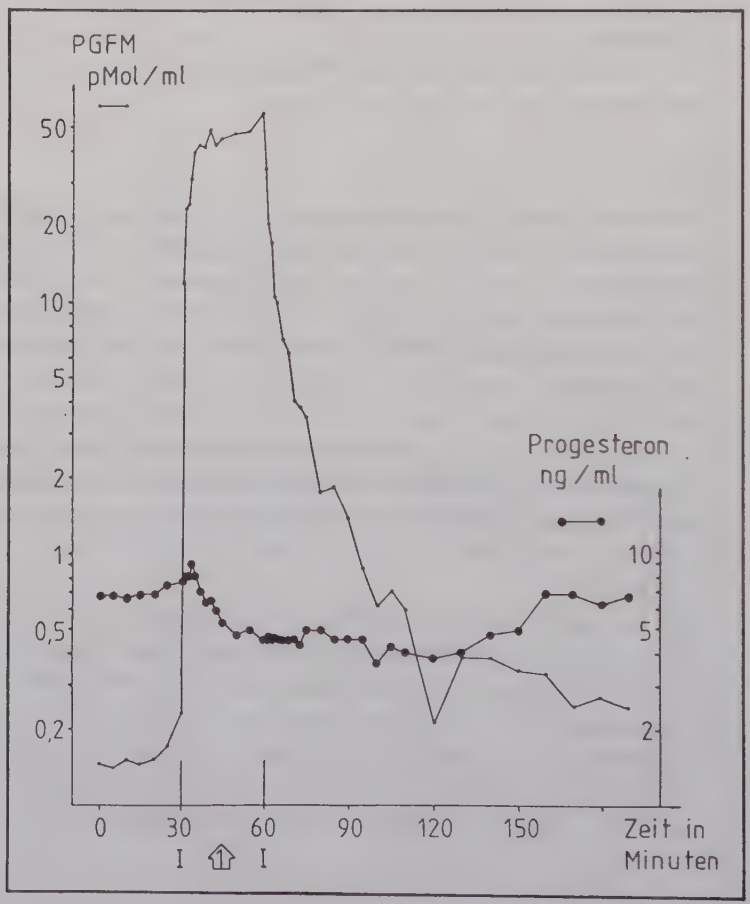
Die Konzentration im Plasma stieg von einem Basalniveau von unter 2 pg/ml während der Infusion auf Werte von über 40 pg/ml an und fiel innerhalb von 60 Minuten nach Infusionsende wieder auf das Basalniveau ab (Abb. 26, Tab. 24).

Progesteron

Die Infusion von $PGF_{2\alpha}$ verursachte einen deutlichen Abfall der Konzentration an Progesteron im Plasma um 1-2 ng/ml vom Basalniveau von ca. 6,8 ng/ml (Abb. 25,Tab. 24). Dies verdeutlicht die negative Korrelation von $PGF_{2\alpha}$ und Progesteron.

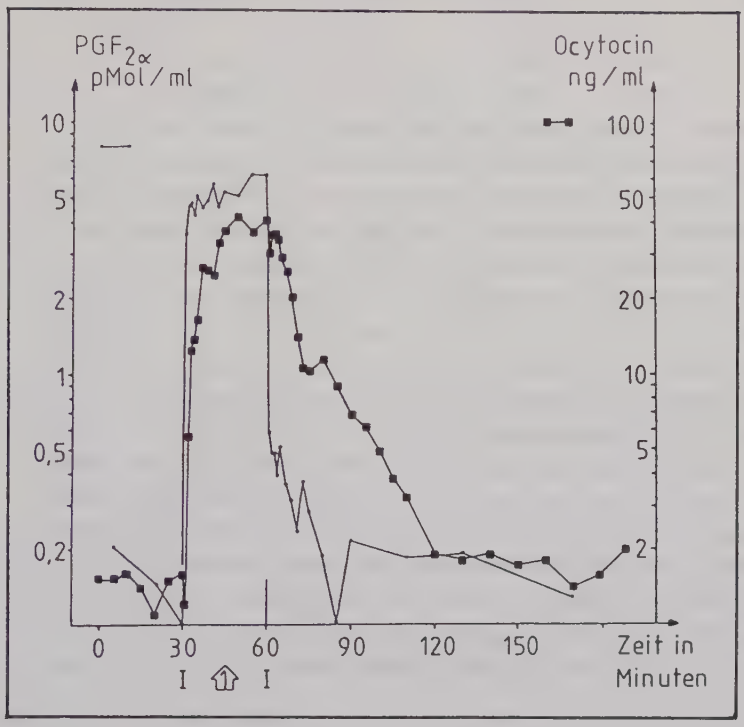
Die Progesteronkonzentrationen erreichten 90 Minuten nach Infusionsende wieder ihr Ausgangsniveau.Die zugeführte Menge an $PGF_{2\alpha}$ hat also nicht ausgereicht,um Luteolyse auszulösen.

Abb. 25 : PGFM Halbwertszeit
Versuch I (PGFM,Progesteron)



⇧ : Infusion von 9,32 mg $PGF_{2\alpha}$

Abb. 26 : PGFM Halbwertszeit
Versuch I ($PGF_{2\alpha}$,Ocytocin)



⇧ : Infusion von 9,32 mg $PGF_{2\alpha}$

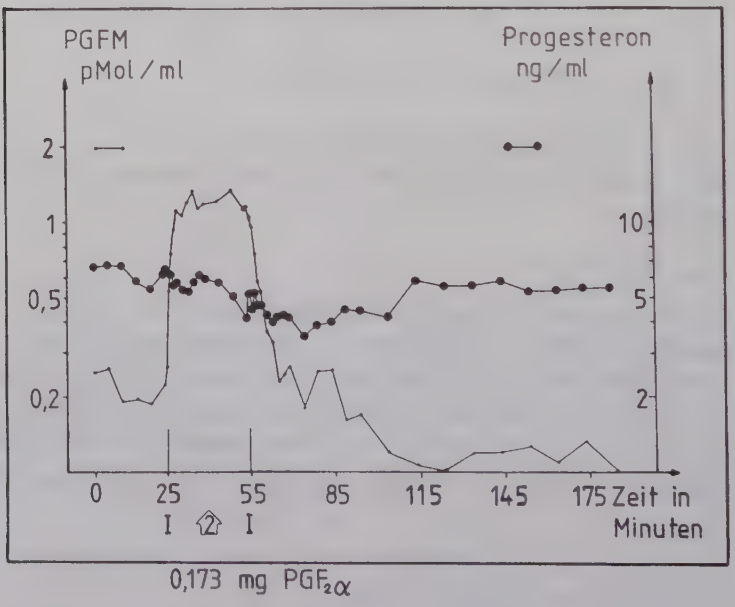
b,Versuch II (Infusion von 0,173 mg $PGF_{2\alpha}$)
Hier wurden nur die PGFM und Progesteronkonzentrationen bestimmt.

PGFM
Der zweite PGFM Halbwertszeitversuch brachte eine weitgehende Klärung der im Versuch I aufgeworfenen Fragen. Die Konzentration an PGFM im Plasma stieg von einem Basalniveau von ca. 120 fMol/ml nach Infusionsbeginn rasch auf Werte von ca. 1 pMol/ml.Nach Infusionsende fiel die Konzentration wieder steil ab.Die Darstellung der ermittelten

Werte ergab einen annähernd exponentiellen,der logarithmierten Werte demgemäß einen annähernd linearen Verlauf bis auf das Basalniveau (Abb. 27,Tab. 25).
Die errechnete Halbwertszeit von 3,6 Minuten dürfte der physiologischen Halbwertszeit sehr nahe kommen.
Die unterschiedlichen Halbwertszeiten des 1.Versuchs dürften auf Verteilungsphänomenen im Organismus beruhen.
Die ermittelte Halbwertszeit von ca. 3,6 Minuten lassen PGFM als guten Marker der $PGF_{2\alpha}$ Freisetzung beim Rind erscheinen,der auch kurzfristige Konzentrationsänderungen wiederzuspiegeln vermag.

Progesteron
Auch durch die Infusion von 0,173 mg $PGF_{2\alpha}$wurde ein Abfall der Progesteronkonzentration um 1-2 ng/ml vom Basalniveau von ca. 6,2 ng/ml ausgelöst.Die Konzentration erreichte 60 Minuten nach Infusionsende wieder das Ausgangsniveau (Abb. 27,Tab. 25).
Eine dosisabhängige Reaktion der Progesteronsekretion auf die Gabe von $PGF_{2\alpha}$ hin,zeichnet sich ab.

Abb. 27 : PGFM Halbwertszeit
Versuch II (PGFM,Progesteron)



2.Bestimmung der PGEM Halbwertszeit
Die Auswertung der Plasmaproben wurde in derselben Weise durchgeführt,wie beim ersten PGFM Halbwertszeitversuch.

PGEM
Die Konzentration an PGEM im Plasma stieg von ca. 200 fMol/ml auf über 14 pMol/ml während der Infusion von PGE_2 an. Nach Infusionsende fiel die Konzentration an PGEM mit einem dem 1.PGFM Halbwertszeitversuch sehr ähnlichen Kurvenverlauf ab.Das Basalniveau wurde 60 Minuten nach Infusionsende erreicht (Abb. 28,Tab. 26).
Die Berechnung der Halbwertszeit mittels der Regressionsgeraden der logarithmierten Konzentrationswerte gegen die Zeit ergab ebenfalls ein sehr ähnliches Bild :

0 - 5	Minuten	nach	Infusionsende	ca. 3 Minuten
5 - 15	"	"	"	ca. 5 Minuten
15 - 60	"	"	"	ca. 17 Minuten

Aus diesem dem 1.PGFM Halbwertszeitversuch sehr ähnlichen Verhalten wurden ebenfalls Verteilungsphänomene als Grund angenommen.Demgemäß erscheint eine Halbwertszeit von ca. 5 Minuten vorzuliegen.Die PGEM Messung spiegelt demgemäß eine PGE_2 Sekretion sehr gut wieder.

PGE_2
Parallel zum 1.PGFM Halbwertszeitversuch passierte auch hier ein Teil des infundierten primären Prostaglandins die Lunge,ohne metabolisiert zu werden.Der Anteil von ca. 25% im Vergleich zu PGEM erscheint sehr hoch und beruht eventuell auf mangelnder Bestimmungspräzision.
Während der Infusion traten starke Schwankungen der PGE_2 Konzentration auf,die durch ungleichmäßigen Lauf der Peristaltikpumpe hervorgerufen sein können.
Ansonsten ähnelt der Konzentrationsverlauf (Abb. 29, Tab. 26) sehr stark dem ersten PGFM Halbwertszeitversuch. Während der Infusion stieg die Konzentration an PGE_2 von Werten unterhalb der Nachweisgrenze auf maximal 3,5 pMol/ml.Nach Infusionsende sank die Konzentration wieder auf das Ausgangsniveau ab.

Ocytocin

Die Konzentration von Ocytocin im Plasma stieg während der Infusion von PGE_2 von einem Basalniveau von ca. 2,5 pg/ml auf maximal 59 pg/ml an (Abb. 29,Tab. 26).Nach Infusionsende fiel die Konzentration innerhalb von 60 Minuten wieder bis annähernd das Ausgangsniveau ab.
$PGF_{2\alpha}$ und PGE_2 zeigen also diesselbe direkte Auswirkung auf die Ocytocinsekretion.

Progesteron

Die Progesteronkonzentration wurde durch die PGE_2 Infusion in keinem Fall negativ beeinflußt.Die Werte lagen während der Infusion auf einem eher höheren Niveau.Der Anstieg der Progesteronkonzentration begann jedoch schon vor Beginn der Infusion,so daß eine positive Korrelation von PGE_2 und Progesteron nicht zu beweisen ist (Abb. 28,Tab. 26).

Abb. 28 : PGEM Halbwertszeit (PGEM,Progesteron)

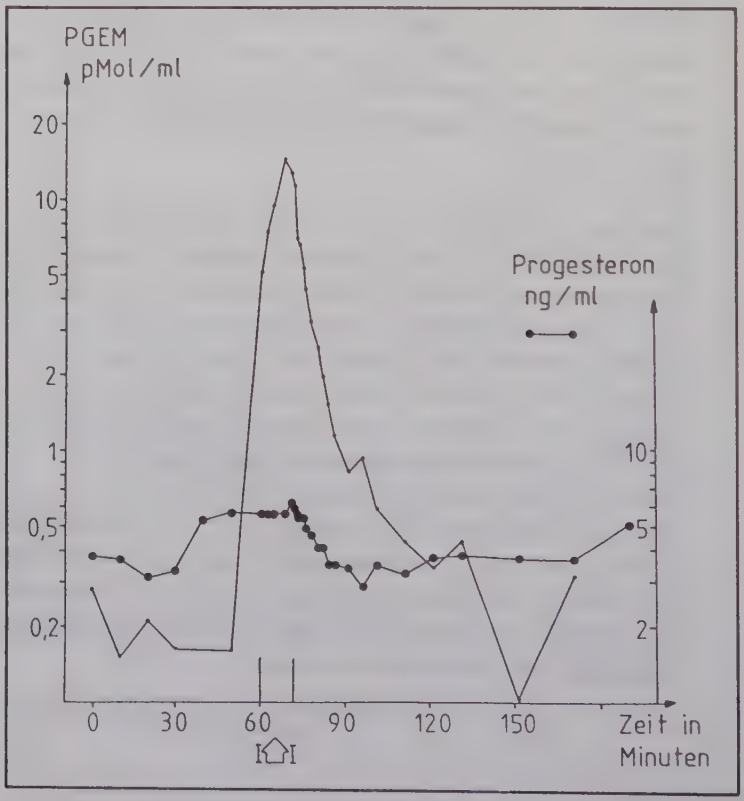
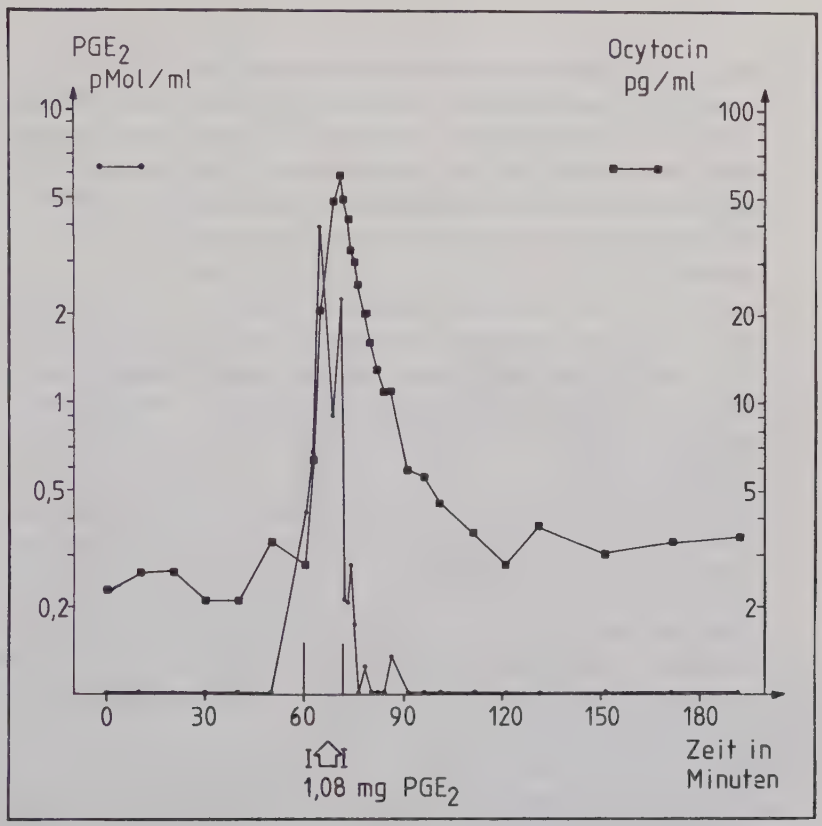


Abb. 29 : PGEM Halbwertszeit (PGE_2,Ocytocin)



B,Prostaglandinfreisetzung im physiologischen Zyklus

Die radioimmunologische Bestimmung der $PGF_{2\alpha}$,PGFM,PGE_2 und PGEM Konzentrationen wurde nach Vorreinigung der Plasmaproben durchgeführt.Die PGE_2 und PGEM Messungen konnten auf Grund des in IIID,4 gesagten nicht ausgewertet werden. Die $PGF_{2\alpha}$ und PGFM Konzentrationen zeigten einen parallelen Verlauf,so daß auf eine Differenzierung verzichtet wurde.

Tab. 17 : Katheterposition der erfolgreich operierten Tiere

Kalbin	Katheter-länge	Progesteron ng/ml V.cava	V.jugularis	Verhältnis
"Resana"	65 cm	346,0	9,3	37,2 : 1
"Rolfi"	65 cm	86,6	9,6	9,0 : 1
"Burgl"	70 cm	22,3	12,9	1,7 : 1

Das Verhältnis der Progesteronwerte in Vena cava und Vena jugularis läßt auf eine sehr gute Katheterlage bei "Resana" und "Rolfi" und auf eine eher mäßige bei "Burgl" schließen.Letzteres Tier wurde am Zyklustag 15 nachoperiert, und der Katheter ca. 5 cm zurückgezogen.Die Progesteronwerte veränderten sich jedoch kaum.
Ein Vergleich der absoluten Höhe der Meßergebnisse ist auf Grund der sehr unterschiedlichen Katheterposition nicht möglich,bei "Burgl" erbrachte die $PGF_{2\alpha}$ Messung kaum auswertbare Ergebnisse.
Das Ergebnis dieses Versuches wurde auch insofern beeinträchtigt,als der Katheter der Kalbin "Burgl" starke Rückflußstörungen aufwies,so daß viele Blutproben nicht entnommen werden konnten und der Katheter am Tag 3 des folgenden Zyklus gezogen werden mußte.Der Katheter der Kalbin "Resana" war ebenfalls zwischen Tag 18 und 19 zeitweise nicht durchgängig,die Katheterposition verschlechterte sich zudem ab diesem Zeitpunkt so stark,daß kaum noch Aussagen über die $PGF_{2\alpha}$ Freisetzung gemacht werden konnten.

Das Ergebnis der 3-stündigen Entnahmen zeigen die Abbildungen 30 - 32 a .
Das Ergebnis der frequenten Entnahmen wird nur an den Tagen 17 - 20 wiedergegeben,da aus den anderen Kurzzeitentnahmen kaum zusätzliche Informationen geliefert wurden (Abbildungen 30 - 32 b).Alle Meßergebnisse der Kalbin Rolfi,bis auf Ocytocin und Östradiol sind in Tab. 27 wiedergegeben.
Die Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Konzentration pulsiert zwischen Tag 9 und 16 und zwischen Tag 21 und 8 des folgenden Zyklus nur schwach auf einem Niveau von unter 1 pMol/ml Plasma.
Bei der Kalbin "Rolfi" erscheint am Tag 2 des Zyklus ein nochmaliger $PGF_{2\alpha}$ Anstieg.An diesem Tag wurde bei diesem Tier eine deutliche postöstrische Abblutung beobachtet,die offenbar von $PGF_{2\alpha}$ Freisetzung aus dem Uterus begleitet war.
Zwischen Tag 16 und 20 kommt es zu massiven $PGF_{2\alpha}$ Freisetzungen bei allen drei Tieren.Bei der Kalbin Resana werden Maximalkonzentrationen von 17 pMol/ml erreicht.
Gleichzeitig mit diesen Freisetzungen verringert sich die Progesteronkonzentration deutlich.
Bei "Resana" und "Rolfi" wurde der Ovulationstermin durch Messung des LH-Peaks verifiziert.
Die Konzentrationen an Ocytocin im Plasma verlaufen auffallend parallel zu den $PGF_{2\alpha}$ Werten.Die Ocytocinkonzentrationen erreichten ihre Maximalwerte vor den entsprechenden $PGF_{2\alpha}$ Pulsen,sanken jedoch zu einem Zeitpunkt wieder ab,an dem noch massive $PGF_{2\alpha}$ Freisetzungen registriert wurden.

Abb. 30 a : $PGF_{2\alpha}$, Ocytocin und Progesteron
Kalbin "Resana"; 3-stündige Blutentnahme

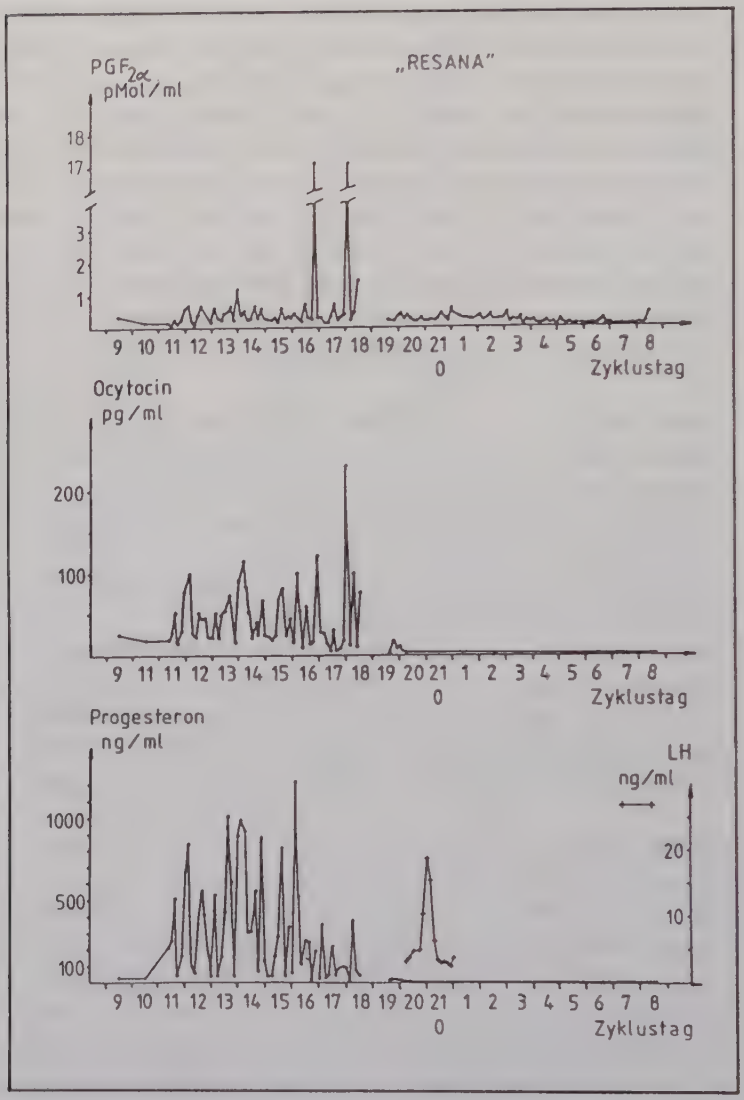


Abb. : 30 b : $PGF_{2\alpha}$, Ocytocin und Progesteron
Kalbin "Resana" an den Zyklustagen 17-20
3-stündige und 15-minütige Blutentnahme

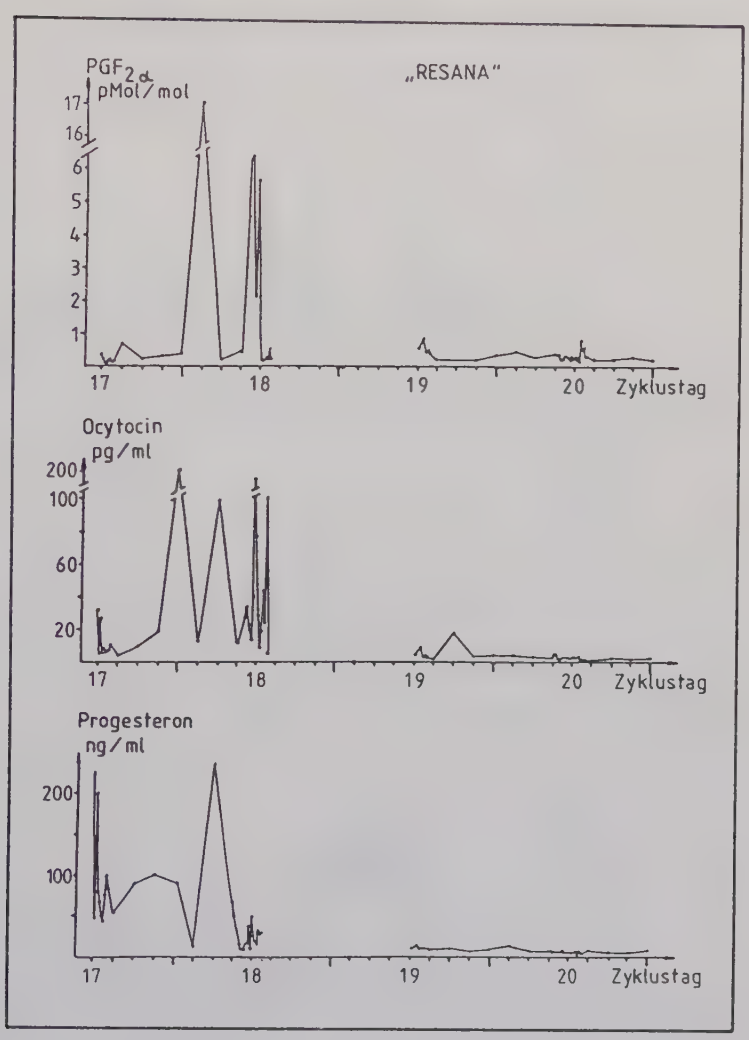


Abb. 31 a : $PGF_{2\alpha}$, Ocytocin und Progesteron
Kalbin "Rolfi"; 3-stündige Blutentnahme

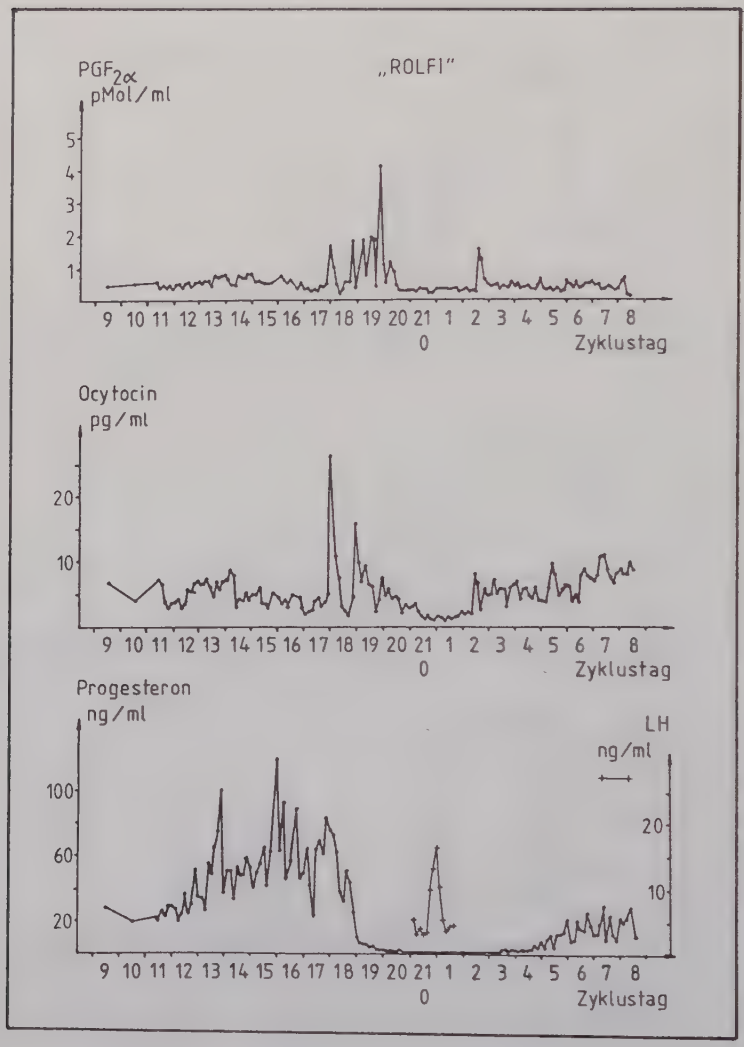


Abb. 31 b : $PGF_{2\alpha}$,Ocytocin und Progesteron
Kalbin "Rolfi" an den Zyklustagen 17-20
3-stündige und 15-minütige Blutentnahme

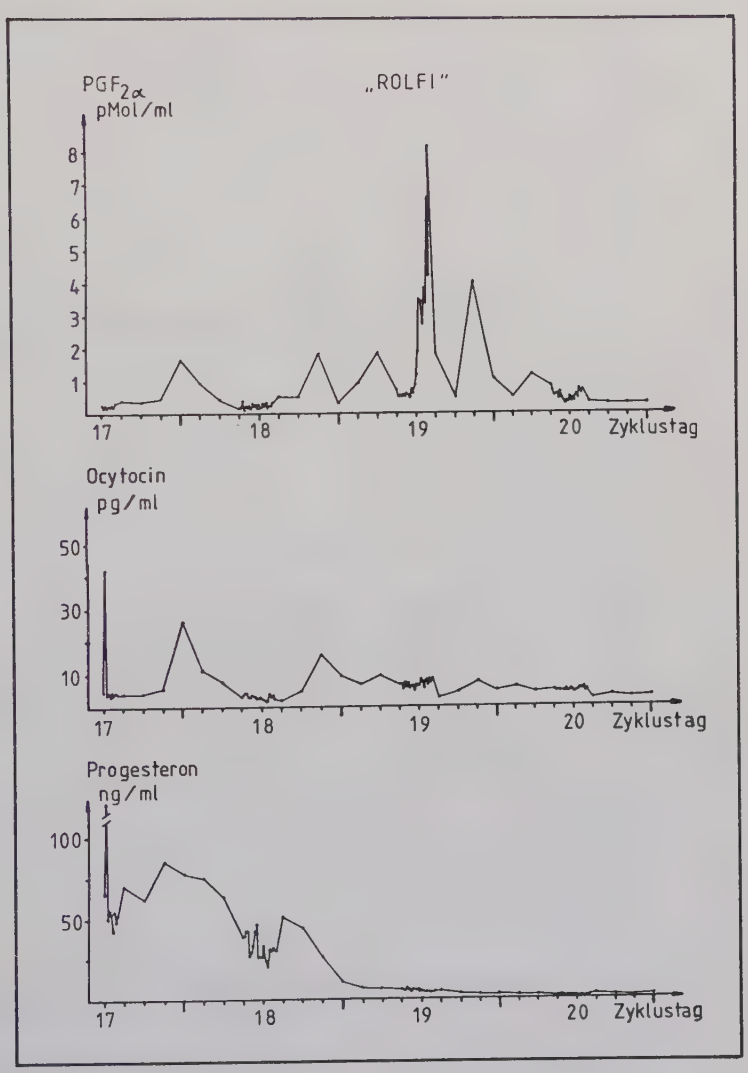


Abb. 32 a : PGFM,Ocytocin und Progesteron
Kalbin "Burgl"; 3-stündige Blutentnahme

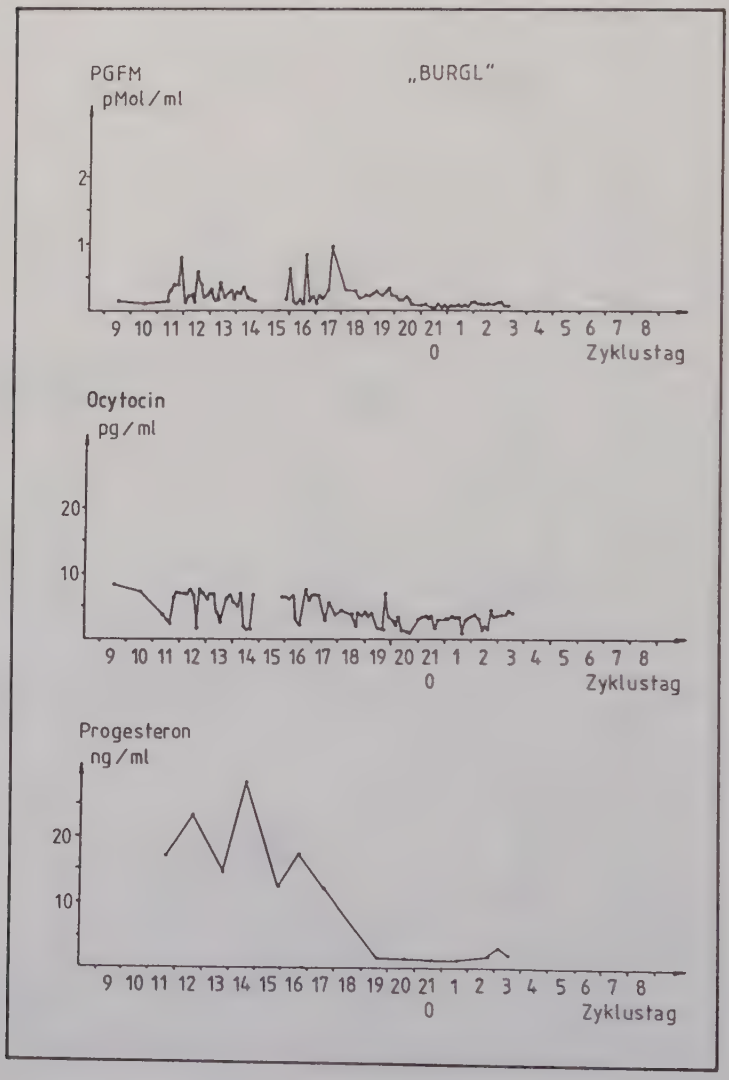
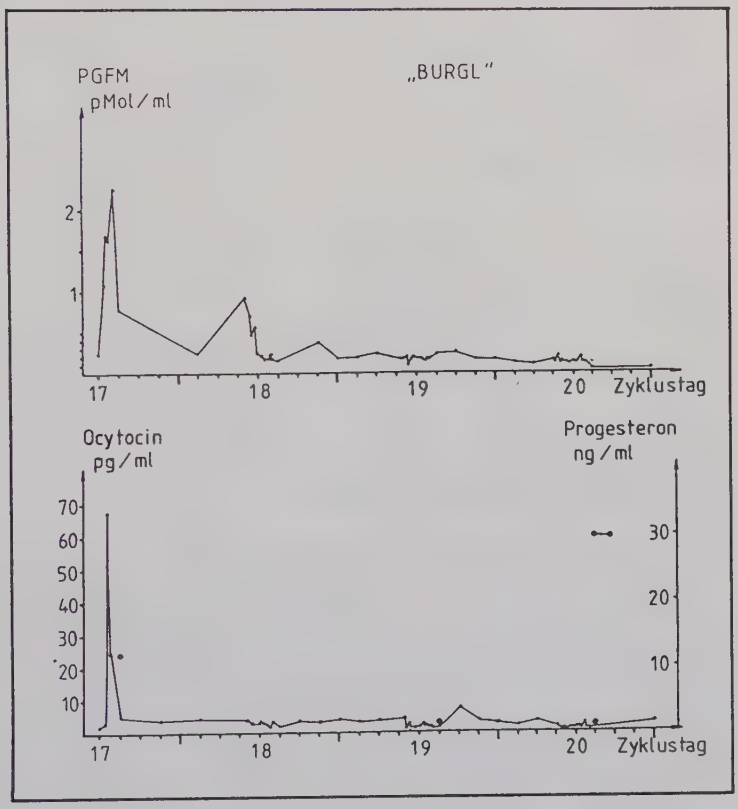


Abb. 32 b : PGFM,Ocytocin und Progesteron
Kalbin "Burgl" an den Zyklustagen 17-20
3-stündige und 15-minütige Blutentnahme



C,Auswirkungen der Behandlung von Kalbinnen mit Ocytocinantikörpern

Die Auswertung der Plasmaproben wurde im RIA ohne Vorreinigung in Einzelbestimmung durchgeführt.In Vena cava Proben wurde $PGF_{2\alpha}$,in Aorta und Vena jugularis Proben PGFM bestimmt. Die ermittelten Werte wurden durch repräsentative Kontrollmessungen von ca. 20% der Proben im RIA mit Vorreinigung überprüft.Es ergab sich eine gute Übereinstimmung.

Tab. 18 : Katheterposition der erfolgreich operierten Tiere

Kalbin	Progesteron ng/ml V.cava	V.jugularis	Verhältnis
antikörperbehandelte Tiere			
"Kerina"	7,47	5,50	1,4 : 1
"Kuni"	14,94	3,69	4,1 : 1
"Kibitz"	33,62	4,21	8,0 : 1
"Rispe"	9,6	7,04	1,4 : 1
plasmabehandelte Kontrolltiere			
"Rita"	6,4	5,55	1,2 : 1

Die Katheterposition ist demnach nur bei den Tieren "Kuni" und "Kibitz" als gut zu bezeichnen.Bei den anderen Tieren reichte die Katheterlänge von 63 cm nicht aus,um Blut cranial der Ovarveneneinmündung gewinnen zu können.
Die Vena cava Katheter von "Rita" und "Kerina" waren ab Zyklustag 8 nicht mehr durchgängig,auch bei den anderen Tieren war an einigen Tagen kein Blut zu gewinnen.Die Antikörperbehandlung belastete die Tiere stark,so daß gegen Versuchsende die Futteraufnahme zurückging,zudem traten bei "Kibitz" und "Kerina" Klauenbeschwerden,bzw. Gelenkentzündungen auf.
Die Behandlung wurde dennoch wie geplant durchgeführt.

Die Behandlung mit Ocytocinantikörpern führte zu keiner deutlichen Zyklusverlängerung (Tab. 19).

Tab. 19 : Zyklusdaten der Kalbinnen im Versuch Ocytocin-Antikörper

Kalbin	Zykluslänge in Tagen vor Behandlung n(Zyklen)	$\bar{x}$	S.D.	während $\bar{x}$	
Antikörperbehandelte Tiere					
"Katja"	3	22,3	3,79	24	
"Kerina"	2	20,0	2,83	22	
"Kibitz"	2	20,0	1,41	25	
"Kuni"	2	22,5	2,12	22	
"Rispe"	3	22,0	1,00	24	
gesamt		21,4	1,25	23,4	S.D. 1,34
Plasmabehandelte Kontrolltiere					
"Kosa"	3	21,3	0,58	20	
"Riola"	2	22,5	0,71	22	
"Rita"	2	21,0	0	20	
gesamt		21,6	0,79	20,67	S.D. 1,15

Nur die Tiere "Rispe" und "Kibitz" wiesen demnach eine Zyklusverlängerung auf,die der doppelten Standardabweichung entspricht,bzw. darüber hinausgeht.
Auch die Auswertung im "beidseitigen Wilcoxon Rang Test" zeigte auf 5% Niveau keine signifikante Zyklusverlängerung der antikörperbehandelten Tiere,sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe,als auch zu den vorhergehenden Zyklen der gleichen Gruppe.Zudem darf die Bewertung der Ursache der Zyklusverlängerung bei der Kalbin "Kibitz" nach dem oben Gesagten nur unter großen Vorbehalten erfolgen.

Prostaglandinmessung

Das Ergebnis der Vena cava Proben unterscheidet sich nicht wesentlich von den Messungen während des physiologischen Zyklus.
Während der Zyklustage 1 - 16 traten kaum Schwankungen der Plasmakonzentrationen an $PGF_{2\alpha}$ auf.Die Ergebnisse

an den Zyklustagen 17 - 21,bzw. 20 ("Kibitz" Katheter gezogen) zeigen die Abbildungen 33 - 36 .
Auffallend ist das niedrige Niveau der $PGF_{2\alpha}$ Konzentrationen im Plasma bei "Kibitz" bis zum Zyklustag 18 ,das an Tag 19 und 20 durch,der guten Katheterposition entsprechende,massive Freisetzungen abgelöst wurde (bis 11 pMol/ml).
Auch bei "Rispe",der zweiten Kalbin mit einer möglichen Zyklusverlängerung wurden erst ab Tag 19 höhere $PGF_{2\alpha}$ Konzentrationen gemessen (bis 3,5 pMol/ml).
Bei "Kuni" dagegen liegt das allgemeine Niveau der $PGF_{2\alpha}$ Konzentration etwas höher und ab Zyklustag 18 wurden Ausschläge bis 4 pMol/ml gemessen.Bei diesem Tier ließ sich die negative Korrelation von $PGF_{2\alpha}$ und Progesteron besonders deutlich erkennen.Bei jedem $PGF_{2\alpha}$ Puls sank die Progesteronkonzentration deutlich ab.
Auch bei den anderen Tieren zeigten die Progesteronmessungen einen den Messungen im physiologischen Zyklus entsprechenden Verlauf;ebenso die Dauer der $PGF_{2\alpha}$ Freisetzungen mit ca. 3-4 Stunden.
Die Auswertung der PGFM Bestimmung in den Plasmaproben der zusätzlichen frequenten Blutentnahmen aus Aorta und Vena jugularis erbrachte keine Unterschiede zwischen antikörper- und plasmabehandelten Tieren.
Die Auswertung der Messung des gesamten Ocytocin erbrachte eine deutliche Akkumulierung bei den antikörperbehandelten Tieren im Zyklusverlauf.Im Gegensatz zu den plasmabehandelten Tieren,die Konzentrationen im Rahmen der im physiologischen Zyklus ermittelten Werte aufwiesen,wurden hier selbst in der Aorta Konzentrationen bis 200 pg/ml ermittelt (Kontrollen unter 10 pg/ml).

Die Messung des "freien" Ocytocin,d.h. des unter den Testbedingungen bei Zimmertemperatur nicht antikörpergebundenen Ocytocin,erbrachte jedoch,daß die antikörperbehandelten Tiere eine nur um ca. 33% niedrigere Konzentration aufwiesen, als die plasmabehandelten Kontrolltiere (jeweils Aorta bzw. Vena jugularis Proben).
D.h. der Versuch,die zirkulierende Ocytocinmenge durch Antikörpergaben zu beseitigen oder wenigstens entscheidend zu verringern,war gescheitert.

Tab. 20 : "Freies" und "Gesamtocytocin" während der zusätzlichen frequenten Blutentnahmen aus der Aorta bzw. Vena jugularis;Vergleich der durchschnittlichen Konzentrationen während der Behandlungstage

Zyklustag	Antikörperbehandelte Tiere "frei" Ocytocin pg/ml			"gesamt" Ocytocin pg/ml		
	n	$\bar{x}$	S.D.	n	$\bar{x}$	S.D.
3	3	2,17	1,42	2	7,17	1,29
6	3	2,93	1,94	2	46,48	22,92
9	4	2,63	0,93	4	85,84	21,24
12	4	2,05	0,50	4	104,64	38,65
15	4	2,40	0,77	4	124,63	35,14
18	4	1,85	0,47	4	94,97	29,30
gesamt	6	2,34	0,40	6	77,29	42,99
	Plasmabehandelte Kontrolltiere					
3	2	2,20	0,85	2	2,86	0,23
6	2	3,85	0,64	2	2,85	0,05
9	2	5,05	0,07	2	3,09	0,08
12	2	4,00	0,00	2	4,66	0,76
15	2	2,75	0,07	2	5,22	0,40
18	2	2,80	0,28	2	2,75	0,26
gesamt	6	3,47	1,06	6	3,57	1,08

Abb. 33 : Versuch Ocytocin-Antikörper
Kalbin "Kibitz" - $PGF_{2\alpha}$ und Progesteron
an den Zyklustagen 17-20

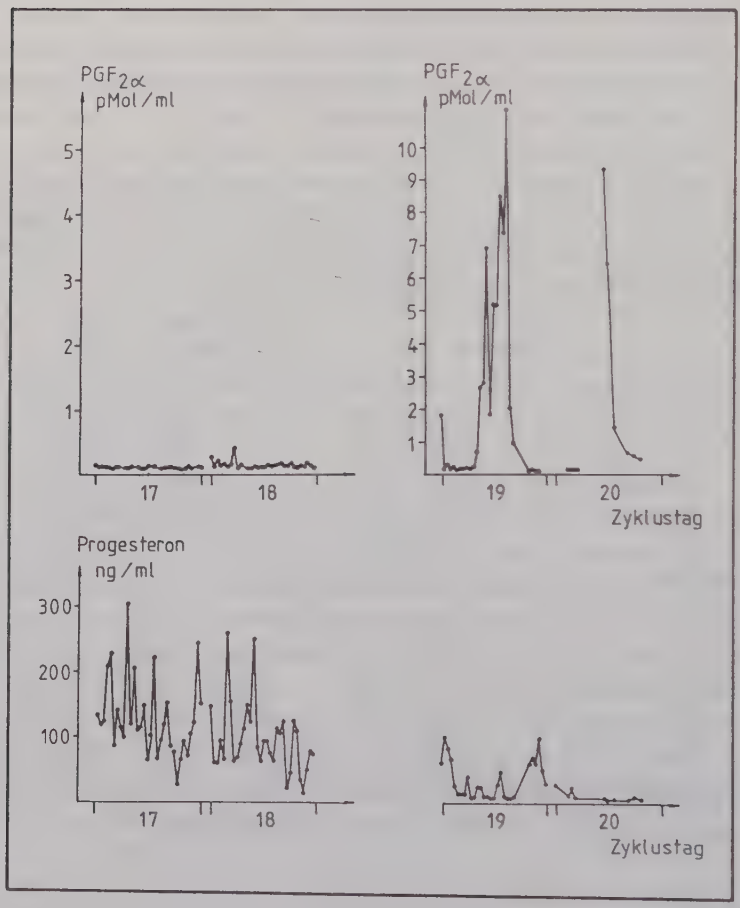


Abb. 34 : Versuch Ocytocin-Antikörper
Kalbin "Rispe" - $PGF_{2\alpha}$ und Progesteron
an den Zyklustagen 17-21

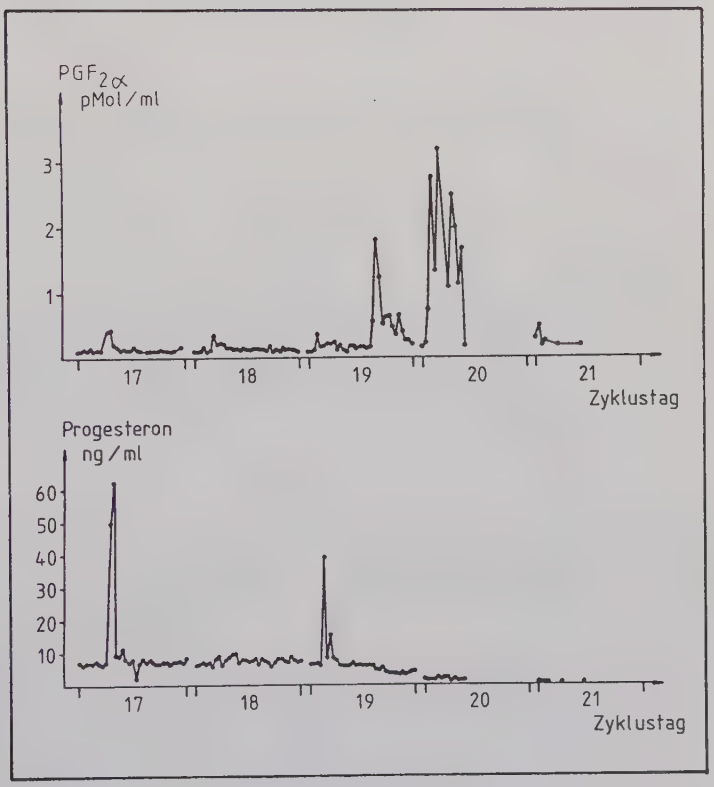
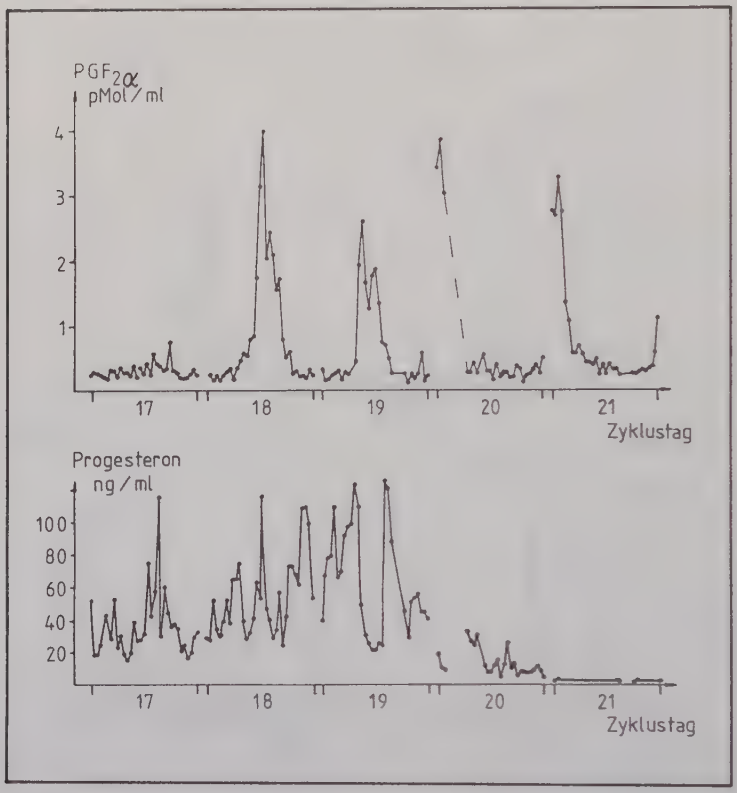


Abb. 35 : Versuch Ocytocin-Antikörper
Kalbin "Kuni" - $PGF_{2\alpha}$ und Progesteron
an den Zyklustagen 17-21



D,Auswirkungen von Ocytocininjektionen

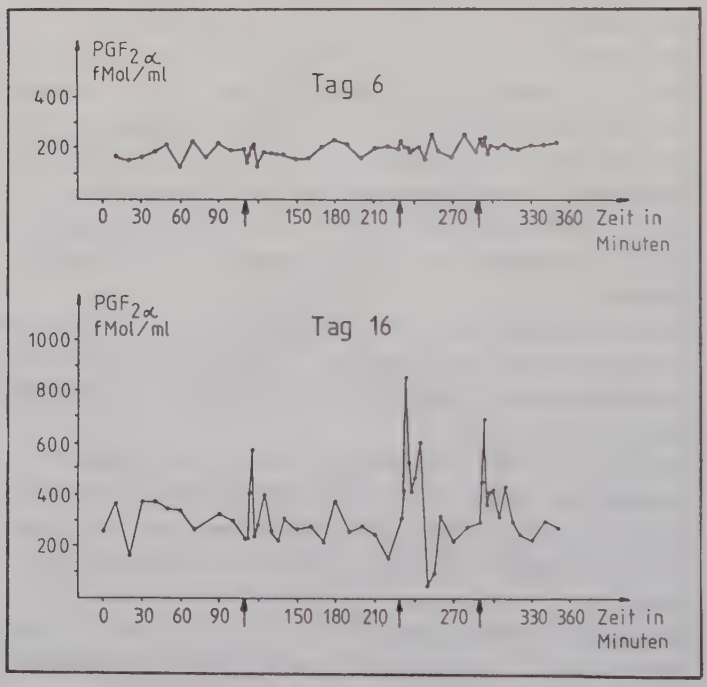
Die Prostaglandinmessung wurde im RIA nach Vorreinigung und im Direkttest ausgeführt (jeweils $PGF_{2\alpha}$ und PGFM).
Die Auswertung der Progesteronvergleichsmessung ergab folgende Katheterpositionen (Verhältnis Progesteronkonzentration in Vena cava caud./Vena jugularis)

"Arche" 4 : 1
"Lunte" 1 : 1

D.h. bei der Kalbin "Lunte" lag die Kathetermündung kaudal der Ovarveneneinmündung.
Die Ergebnisse der Bestimmung der $PGF_{2\alpha}$ bzw. PGFM Plasmakonzentrationen zeigen die Abbildungen 36 und 37 .
Die Kalbin "Arche" wies am Zyklustag 6 keine Veränderung der $PGF_{2\alpha}$ Konzentration in Folge der Ocytocininjektionen auf.Am Zyklustag 13 konnten keine Blutproben gewonnen werden.
Die Auswertung der Plasmaproben des Zyklustages 16 ergaben eine deutliche Steigerung der $PGF_{2\alpha}$ Konzentration von ca. 300 fMol/ml auf über 600 fMol/ml jeweils in den ersten 4 Minuten nach Ocytocingabe,der ein rascher Abfall folgte.
Bei diesem Tier wurden am Zyklustag 17 versuchsweise Injektionen mit Noradrenalin (30 μg) und Melatonin (20 mg) durchgeführt.Es resultierte keine Reaktion der $PGF_{2\alpha}$ Sekretion.
Infolge der Katheterposition konnte bei "Lunte" keine $PGF_{2\alpha}$ Freisetzung nach den Ocytocininjektionen gemessen werden. Die PGFM Konzentrationen gaben jedoch ein entsprechendes Ergebnis wieder.Am Zyklustag 6 wurde keine PGFM Konzentrationsänderung gemessen.Am Zyklustag 13 stiegen die ermittelten Werte in den ersten 4 Minuten nach der 2. und 3. Ocytocingabe um 300 bzw. 200 fMol/ml und fielen anschließend rasch wieder ab.
Am Zyklustag 17 wurde eine Aussage über den Einfluß der Ocytocininjektionen durch eine massive physiologische Prostaglandinfreisetzung verhindert.In diesen Plasmaproben wurde auch eine deutliche $PGF_{2\alpha}$ Freisetzung gemessen.

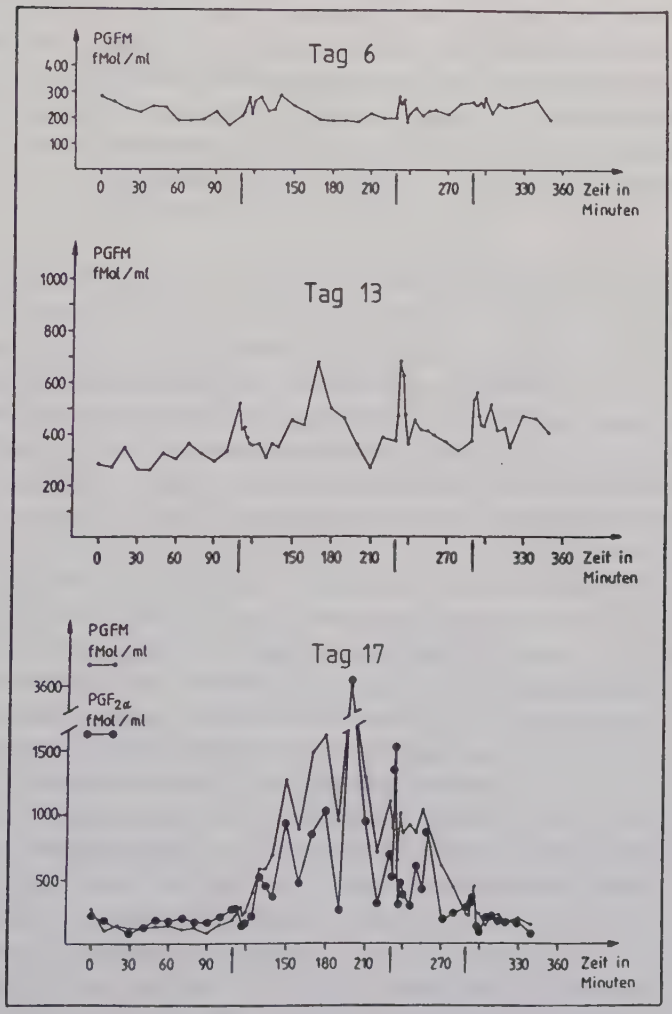
Der Versuch ergab einen deutlichen Einfluß des Zyklusstadiums auf die Auswirkungen von Ocytocingaben auf die $PGF_{2\alpha}$ Sekretion.Am Zyklustag 6 erfolgte im Gegensatz zu den Tagen 13 und 16 keine Steigerung der $PGF_{2\alpha}$ Sekretion nach Ocytocingabe.
Die Zykluslänge wurde durch die Ocytocingaben offensichtlich nicht verkürzt (Zykluslänge während der Behandlung "Arche" 21 Tage,"Lunte" 22 Tage).

Abb. 36 : Versuch Ocytocin-Injektion
Kalbin "Arche" - $PGF_{2\alpha}$ nach Ocytocininjektionen an den Zyklustagen 6 und 16
(Vena cava caudalis)



↑ Injektion von 1 I.E. Ocytocin

Abb. 37 : Versuch Ocytocin-Injektion
Kalbin "Lunte" PGFM ($PGF_{2\alpha}$) nach Ocytocin-injektionen an den Zyklustagen 6,13 und 17 (Vena cava caudalis)



↑ Injektion von einer 1 I.E. Ocytocin

V,Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil eine radioimmunologische Bestimmungsmethode in Plasma für die primären Prostaglandine $F_{2\alpha}$ und E_2,sowie deren 13,14-dihydro-15-keto-Metaboliten beschrieben.Der zweite Teil befaßt sich mit der Untersuchung von Plasmaproben von Rindern im physiologischen Zyklus und unter verschiedenen Versuchsbedingungen;mit dem Ziel,Aufgaben und Wirkung der Prostaglandine im Zyklus des Rindes zu klären.

A,Diskussion der Methoden

Die Immunisierung von Kaninchen gegen $PGF_{2\alpha}$ lieferte spezifische Antikörper gegen $PGF_{2\alpha}$ mit einer hohen Affinität. Die Kreuzreaktion gegen die untersuchten Prostaglandine (PGFM,PGE_2,PGA_2,PGEM,PGAM) war sehr klein,so daß eine Beeinflussung der Messungen durch diese Prostaglandine auszuschließen war.
Der PGFM Antikörper ist gemäß hochleistungsflüssigkeitschromatographischen Messungen von ähnlicher Qualität.
Die PGE_2 und PGEM bzw. PGAM Messung war nur unter größten Schwierigkeiten in den Griff zu bekommen.Die betreffenden Antiseren erfaßten unspezifische Substanzen aus dem Plasma, die durch die Reinigung mit C 18 beschichteten Silikagelsäulen nicht beseitigt worden waren.So wurden in allen Plasmaproben Prostaglandinkonzentrationen im nM Bereich gemessen,die sich bei Überprüfung mittels der HPLC als Blindwerte herausstellten.
Die Lösung dieses Problems wurde durch Zusatz von Albumin zum verwendeten Puffer erreicht.Das Albumin stellt eine große Adsorptionsfläche für die unspezifischen Substanzen dar.Die Antikörper wurden dadurch frei für die Bindung des spezifischen Antigens und die Blindwerte wurden beseitigt.Leider konnten durch diese Schwierigkeiten in der

Bestimmungsmethode die Tierversuche nicht hinsichtlich der Prostaglandin E Konzentrationen im Plasma ausgewertet werden.Die anfänglich durchgeführten Messungen waren auf Grund der eben erläuterten fehlerhaften Ergebnisse ohne Aussagekraft.

Die Nachweisgrenzen der bestimmten Prostaglandine lagen zwischen 40 und 120 fMol/ml Plasma.Dies erlaubte eine Messung auch niedriger Konzentrationen.Die Eichkurven waren bis zu 1000 fMol ($PGF_{2\alpha}$,PGFM) bzw. 2000 fMol (PGE_2,PGEM) auswertbar,so daß auch starke Konzentrationsschwankungen zumeist erfaßt wurden.

Die Werte der Doppelbestimmungen zeigten zumeist eine gute Übereinstimmung.Betrug die Abweichung der gemessenen Aktivität mehr als 5% wurde das betreffende Ergebnis entweder nicht berücksichtigt oder die Messung wiederholt.

Die Reinigung der Plasmaproben mittels C 18 beschichteten Silikagelsäulen brachte im Vergleich zu herkömmlichen Extraktionsmethoden (Äther,Chloroform) eine wesentliche Vereinfachung.In Hinsicht auf die Probenzahl bei den durchgeführten frequenten Blutentnahmen gestaltete sie sich dennoch material- und zeitaufwendig.
Daraufhin wurde eine Methode entwickelt,$PGF_{2\alpha}$ und PGFM in Plasma direkt zu bestimmen.Diese Methode erbrachte vergleichbare Ergebnisse mit dem Nachteil,daß durch eine sehr begrenzte einsetzbare Plasmamenge die Nachweisgrenze bei 250 fMol/ml lag.Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen und schnellen Durchführbarkeit,die die Auswertung großer Probenzahlen in kurzer Zeit erlaubt.Zudem entfällt die Gefahr der Messung von Reagenzienleerwerten durch verunreinigte Lösungsmittel.
Die Bestimmungen im Direkttest wurden im Einzelansatz durchgeführt.Diese Maßnahme erschien uns gerechtfertigt,da im Direkttest im Gegensatz zur Prostaglandinbestimmung nach Vorreinigung des Plasmas Probleme wie Reagenzienleerwerte, unterschiedliche Wiederfindung u.ä. wegfallen und die

von uns durchgeführte frequente Blutprobenahme einen Sekretionsverlauf erkennen läßt.
Ergebnisse,die deutlich von den vergleichbaren Nachbarproben abwichen wurden wiederholt.
Die Messung wurde zusätzlich durch Auswertung von ca. 20% der direkt untersuchten Proben mittels der Methode nach Vorreinigung überprüft.Es ergab sich eine gute Übereinstimmung.

Die angewendeten Qualitätskriterien erbrachten brauchbare Ergebnisse für beide Methoden.
Die Genauigkeit der Messung ist nach Vorreinigung der Plasmaprobe größer.
Die Reproduzierbarkeit der Methoden,verifiziert mittels Bestimmung der Inter- und Intraassayvariation,wurde nur für $PGF_{2\alpha}$ und PGFM bestimmt (Tab. 13,14).
Die ermittelten Werte liegen in einem annehmbaren Bereich.
Der Einfluß der Einzelbestimmung im Direkttest drückt sich durch höhere Variationen aus.

Die Entscheidung,ob es vorteilhafter ist,die primären Prostaglandine oder ihre 13,14-dihydro-15-keto-Metaboliten zu bestimmen,richtet sich nach der Fragestellung und den Möglichkeiten (Operation).
Die Bestimmung der Metaboliten in peripheren Gefäßen ist mit wesentlich geringerem Aufwand und auch geringerer Belastung für die Versuchstiere verbunden.
Zudem werden die gewonnenen Ergebnisse auch in der absoluten Höhe vergleichbar.Kleinere und kurzzeitige Konzentrationsschwankungen werden jedoch nicht so deutlich wiedergegeben wie bei der Messung der primären Prostaglandine in der Vena cava caudalis.
Für die Untersuchung der Feinabstimmung der Regelkreise im reproduktiven Zyklus ist daher die Messung der primären Prostaglandine,trotz des Fehlens der Vergleichbarkeit der absoluten Höhe der Ergebnisse bei verschiedenen Tieren (Katheterposition),die Methode der Wahl.

B,Diskussion der Tierexperimente

1.Ergebnisse der Halbwertszeitbestimmungen

a,PGFM

Der erste PGFM Halbwertszeitversuch erbrachte kein klares Ergebnis.Es wurden Halbwertszeiten zwischen 2,2 und 15 Minuten errechnet.Dieses Phänomen kann auf verschiedenen Ursachen beruhen.Erstens war die infundierte Menge von 9,32 mg $PGF_{2\alpha}$ sehr hoch,so daß Umsatzkinetiken 2.Ordnung eine Rolle gespielt haben können.Als zweiter Faktor sind Verteilungsphänomene bedingt durch das Blutvolumen des Versuchstieres von ca. 50 l in Betracht zu ziehen.
Der zweite PGFM Halbwertszeitversuch brachte eine weitgehende Klärung dieser Fragen.Die Infusion von 0,173 mg $PGF_{2\alpha}$ in 30 Minuten führte zu Konzentrationen an PGFM im Plasma bis maximal 1,3 pMol/ml (im Gegensatz zu 50 pMol/ml im ersten). Diese Konzentration liegt im physiologischen Bereich,wie spätere Messungen während des physiologischen Zyklus zeigten. Verstärkte Enzymreaktionen können ausgeschlossen werden, da die Halbwertszeit hier mit 3,6 Minuten bestimmt wurde. Dieser Wert dürfte der physiologischen Halbwertszeit sehr nahe kommen.Die unklare Aussage des ersten Halbwertszeitversuches dürfte demnach auf Verteilungsphänomenen im Organismus beruhen.Kindahl et al. (1976a) fanden für PGFM eine Halbwertszeit zwischen 7 und 8 Minuten.
Beide Ergebnisse berechtigen dazu,PGFM als guten Marker der $PGF_{2\alpha}$ Sekretion zu betrachten,der auch kurzfristige Konzentrationsschwankungen wiederzuspiegeln vermag.
Für die PGFM Messung spricht vor allem die Tatsache,daß Blutproben aus peripheren Venen entnommen werden können, und so aufwendige Operationen,und damit Belastung der Versuchstiere,vermieden werden.

Während der Infusion passierten etwa 10% des zugeführten $PGF_{2\alpha}$ die Lunge,ohne metabolisiert zu werden.Der rasche Abfall der Plasmakonzentration nach Infusionsende läßt jede $PGF_{2\alpha}$ Messung in peripheren Gefäßen illusorisch erscheinen.
Durch die exogene Zufuhr von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ wurde eine deutliche Ocytocinsekretion ausgelöst.Dies entspricht den Ergebnissen der Arbeitsgruppen Flint und Sheldrick (1982) und Schams und Karg (1980 und 1982),die allerdings beide Prostaglandinanaloge verwendeten.
Dieser deutliche Einfluß von $PGF_{2\alpha}$ auf die Ocytocinsekretion zeigt die enge Korrelation beider Hormone.

Die Progesteronkonzentration dagegen sank während der Infusion.Der leichte Anstieg in den ersten 4 Minuten im ersten PGFM Halbwertszeitversuch ist nicht zu erklären.Die Progesteronwerte erreichten erst 1,5 - 2 Stunden nach Infusionsende wieder ihr Ausgangsniveau.
Die Luteolyse wurde zwar nicht eingeleitet,dazu war scheinbar die Dosis zu gering,doch die potentielle luteolytische Wirkung des $PGF_{2\alpha}$ wurde verdeutlicht.

b,PGEM
Dieser Versuch erbrachte ähnliche Ergebnisse.
Es wurde eine Halbwertszeit zwischen 3 und 17 Minuten errechnet.
Aus der Ähnlichkeit des Konzentrationsverlaufs zum ersten PGFM Halbwertszeitversuch wurde auf ähnliche Verteilungsphänomene geschlossen und eine Halbwertszeit von 5 Minuten als realistisch angenommen.Die Schlußfolgerungen waren analog.
Auch durch PGE_2 Zufuhr wurde eine deutliche Ocytocinsekretion angeregt.Die absolute Höhe kann nicht verglichen werden,da es sich beim ersten Versuchstier um ein hysterektomiertes Tier mit einem Corpus luteum persistens,beim zweiten jedoch um ein Tier mit regulärem Zyklus handelte.
Auch PGE_2 zeigt also,nach den Ergebnissen des PGEM Halbwertszeitversuchs,eine deutlich positive Korrelation zu Ocytocin.

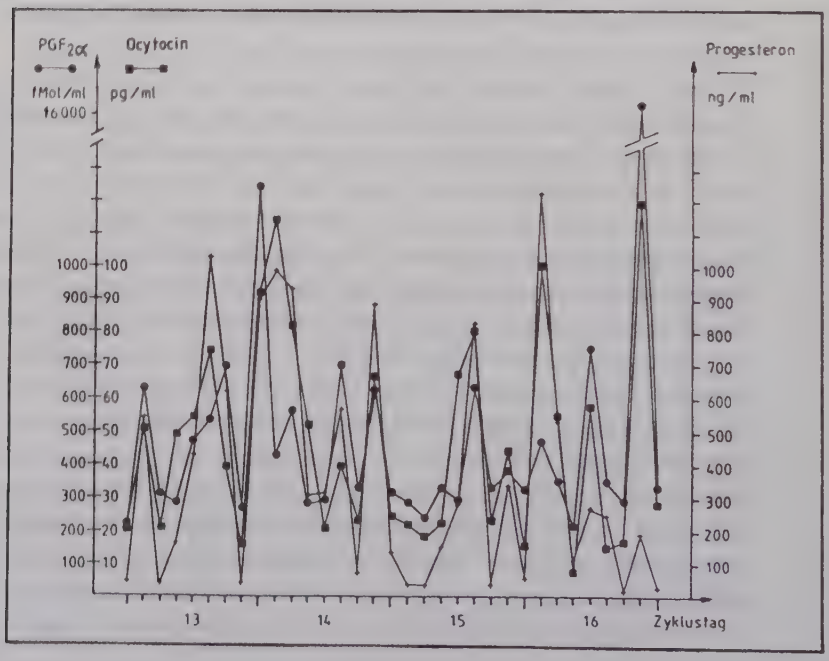
Die Progesteronkonzentrationen dagegen wurden durch die PGE_2 Infusion nicht unterdrückt.Eine luteotrope Wirkung konnte jedoch nicht festgestellt werden.

2.Ergebnisse der Prostaglandinmessungen während des physiologischen Zyklus

Dieser Versuch zeigte,welch entscheidenden Einfluß die Katheterposition auf die absolute Höhe der $PGF_{2\alpha}$ Messung ausübt.Beim Versuchstier "Resana",deren Katheter gemäß Progesteronvergleich,eine optimale Position innehatte, wurde an den Zyklustagen 16 und 18 Maximalkonzentrationen an $PGF_{2\alpha}$ von ca. 17 pMol/ml gemessen.Die Kalbin "Burgl" dagegen,mit einer weniger guten Katheterposition,erreichte nur 1,6 pMol $PGF_{2\alpha}$/ml Plasma.Die Kalbin "Rolfi" lag mit ca. 8 pMol/ml $PGF_{2\alpha}$ am Zyklustag 19 zwischen beiden Extremen.
Die absolute Höhe der Messungen kann also nicht verglichen werden,wohl aber der Sekretionsverlauf.
Bei allen drei Tieren wurden zwischen Tag 9 und 16 geringe Schwankungen auf einem gleichbleibenden Niveau unter 1 pMol/ml festgestellt,ebenso nach Tag 20 .Nur bei der Kalbin "Rolfi" wurde gleichzeitig mit der postöstrischen Blutung ein Anstieg der $PGF_{2\alpha}$ Konzentration auf 1,5 pMol/ml registriert.Der ursächliche Zusammenhang scheint klar zu sein.Dies entspricht den Messungen von Kindahl et al. (1976b). Zwischen Zyklustag 16 und 20 wurden massive $PGF_{2\alpha}$ Freisetzungen mit einer durchschnittlichen Dauer von 3-4 Stunden festgestellt.Der gleichzeitige Abfall der Progesteronkonzentration zeigt die negative Korrelation von $PGF_{2\alpha}$ und Progesteron und verdeutlicht die luteolytische Wirkung des $PGF_{2\alpha}$,die auch die Ergebnisse von Kindahl (1981a), Kindahl et al. (1976a und 1976b) und McCracken et al. (1981) bestätigen.
Die Rolle der Ocytocinskretion in diesem Zusammenhang konnte nicht abschließend geklärt werden.Auffallend war die Koinzidenz von massiven $PGF_{2\alpha}$ und Ocytocinfreisetzungen. Dabei erreichten die Ocytocinkonzentrationen im Plasma ihre Maximalwerte teilweise bevor die maximalen $PGF_{2\alpha}$

Konzentrationen erreicht wurden und fielen (insbesondere bei "Rolfi") wieder ab,während noch massive $PGF_{2\alpha}$ Pulse registriert wurden.Dies deutet auf eine mögliche Funktion als Auslöser der $PGF_{2\alpha}$ Sekretion hin.
Ein ursächlicher Zusammenhang ist jedoch nicht zwingend abzulesen.Die im Rahmen der Teamarbeit vorzulegende Dissertation von H.-J. Breitinger befaßt sich eingehender mit der Interpretation der Ocytocinmessungen.
Die Sekretionsmuster von $PGF_{2\alpha}$,Ocytocin und Progesteron zeigen im Übrigen während der Zyklusphase zwischen Tag 12 und 16 einen überraschend übereinstimmenden Verlauf sowohl während der frequenten (Tab. 27),als auch während der 3-stündigen Blutentnahmen (Abb. 38,Tab. 26).
Ob dies auf einem gemeinsamen Syntheseort und Freisetzungsmechanismus beruht oder welchen Rolle die Blutprobenahme dabei spielte,konnte nicht geklärt werden.

Abb. 38 : Freisetzung von $PGF_{2\alpha}$,Ocytocin und Progesteron im physiologischen Zyklus des Rindes Kalbin "Resana",Zyklustage 13-16, 3-stündige Blutentnahme.



3.Ergebnisse der Behandlung von Kalbinnen mit Ocytocin-Antikörpern

Der Versuch die Luteolyse durch Ocytocinantikörpergaben zu verhindern,um damit die Auslösefunktion von Ocytocin auf die $PGF_{2\alpha}$ Freisetzung zu demonstrieren,scheiterte. Nur bei zwei Tieren konnte,unter den erwähnten Vorbehalten, eine leichte Zyklusverlängerung herbeigeführt werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schams et al. (1983),die durch Ocytocinantikörpergaben bei 4 von 8 Schafen eine deutliche Zyklusverlängerung herbeiführten. Ob dies an physiologischer Verschiedenheit der beiden Spezies gelegen hat,oder dem mißlungenen Versuch,die zirkulierende Menge an "freiem" Ocytocin entscheidend zu verringern,kann im nachhinein nicht geklärt werden. Die Tatsache,daß bei den antikörperbehandelten Tieren die Konzentration an "freiem" Ocytocin nur 33% niedriger ermittelt wurde,als bei den plasmabehandelten Kontrolltieren, kann durch die lange Lebensdauer der Antikörper verursacht worden sein.Der Wert von 33% darf in diesem Zusammenhang nicht als absolut angesehen werden,da die Messung bei Zimmertemperatur ausgeführt wurde und die Konzentration an "freiem" Ocytocin "in vivo",d.h. bei 37°C,wesentlich höher liegen kann.Im Zyklusverlauf wurde eine deutliche Akkumulierung des "Gesamtocytocin" ermittelt.Nach dem Massenwirkungsgesetz liegt ein bestimmter Prozentsatz eines Komplexes dissoziiert vor.Bei steigender Konzentration an "Gesamtocytocin" muß also auch der Anteil an "freiem" Ocytocin steigen; die Dissoziation wird durch Temperaturerhöhung noch verstärkt. Falls schon vergleichsweise niedrige Ocytocinkonzentrationen die Prostaglandinfreisetzung auszulösen vermögen,kann darin das Mißlingen des Versuchs begründet sein.

Die Prostaglandinmessung ($PGF_{2\alpha}$,PGFM) erbrachte keine wesentlichen Unterschiede zwischen antikörperbehandelten Tieren und Kontrolltieren zutage (dieser Vergleich konnte, auf Grund der ungünstigen Operationsergebnisse,nur in Plasma aus Vena jug. und Aorta abd. durchgeführt werden).

Der Verlauf der Prostaglandinsekretion entsprach den Messungen im physiologischen Zyklus.
Auffallend war nur das niedrige $PGF_{2\alpha}$ Niveau bei der Kalbin "Kibitz",dem Tier mit der besten Katheterposition, während des gesamten Zyklus bis Tag 19 (meist unter 300 fMol/ml).Zum Zeitpunkt der Luteolyse wurden dagegen Konzentrationen bis zu 11 pMol/ml erreicht (der Katheterposition entsprechend).
Ob dies ein Effekt der Antikörperbehandlung war,kann aus Mangel an Vergleichswerten nicht entschieden werden.
Der Progesteronverlauf entsprach den Messungen während des physiologischen Zyklus.

4.Ergebnisse von Ocytocininjektionen zu verschiedenen Zyklusphasen

Die $PGF_{2\alpha}$ bzw. PGFM Messung ergab eine deutliche Abhängigkeit der $PGF_{2\alpha}$ Sekretion infolge der Ocytocininjektionen vom Zyklusstadium.Am Zyklustag 6 wurde keine $PGF_{2\alpha}$ Sekretion gemessen,wohl aber an den Tagen 13,16 und 18 .
Eine mögliche Erklärung wäre die Voraussetzung einer gewissen Progesteronkonzentration für die Prostaglandinsekretion. Kindahl et al. (1979) konnten durch Progesteronimplantate den Zyklus bei Kalbinnen verlängern,dabei wurden fortwährende massive $PGF_{2\alpha}$ Freisetzungen gemessen.
Erst das Sinken der Progesteronkonzentration unter ein gewisses Niveau führt also zur Beendigung der Prostaglandinfreisetzung.Eine gewisse Progesteronkonzentration,als Schutzfaktor für das Endometrium,ist jedoch auch Voraussetzung für die Prostaglandinsynthese.Alwachi et al. (1981) fanden eine positive Korrelation in vitro zwischen Progesteronkonzentration und $PGF_{2\alpha}$ Synthese.
Auch dieser Versuch konnte die Auslösefunktion von Ocytocin auf die $PGF_{2\alpha}$ Freisetzung im Zyklus nicht beweisen. Insbesondere,da ja $PGF_{2\alpha}$ Gaben umgekehrt auch eine Ocytocinfreisetzung nach sich ziehen (Halbwertszeitversuche).

Die massive physiologische $PGF_{2\alpha}$ Freisetzung am Zyklustag 17 bei "Lunte" (Tab. 29) lieferte einen deutlichen Hinweis auf den Syntheseort von $PGF_{2\alpha}$.Die Katheterposition dieses Tieres lag gemäß Progesteronvergleichsmessungen kaudal der Ovarveneneinmündung.Wäre also das Ovar der Syntheseort von $PGF_{2\alpha}$,so könnten hier auch massive Freisetzungen kaum gemessen werden (Lungenpassage).Die gemessenen Konzentrationen an $PGF_{2\alpha}$ im Plasma bis 3,7 pMol/ml können also nur aus dem Zufluß der beiden Uterusvenen herrühren,die physiologischerweise kaudal der Ovarvene in die Vena cava einmünden.Da die mittels PGFM Messung registrierten $PGF_{2\alpha}$ Freisetzungen in Folge der Ocytocininjektionen bei $PGF_{2\alpha}$ Messungen in Vena cava Blutproben nicht festgestellt wurden, kann davon ausgegangen werden,daß der Großteil des uterinen $PGF_{2\alpha}$ über die Ovarvene abgeleitet wird.Die genannten Freisetzungen waren zu gering,um bei der starken Verdünnung durch Blut aus der Peripherie im Test erfaßt zu werden. Lukaszewska und Hansel (1980) dagegen vermuteten,auf Grund der hohen Arachidonsäurekonzentration in Corpus luteum Gewebe und der Fähigkeit dieses Gewebes daraus $PGF_{2\alpha}$ zu synthetisieren,eine bedeutende Rolle der $PGF_{2\alpha}$ Synthese im Gelbkörper im Rahmen der Reproduktionsvorgänge. Zusammenfassend dürfte die Hypothese von McCracken et al. (1981),daß zur Zyklusregulierung und Prostaglandinfreisetzung ein Zusammenspiel verschiedener Hormone (Ocytocin, Progesteron,Östradiol) nötig ist,der noch ungeklärten Wirklichkeit am nächsten kommen.

VI,Zusammenfassung

Es wurden radioimmunologische Bestimmungsmethoden für die Prostaglandine $PGF_{2\alpha}$,PGFM,PGE_2 und PGEM in Plasma entwickelt.Die dargestellten Verfahren erlauben eine zuverlässige Messung der Konzentrationen mit Nachweisgrenzen von 40 fMol $PGF_{2\alpha}$/ml,60 fMol PGFM/ml,40 fMol PGEM/ml und 115 fMol PGE_2/ml Plasma.Die Entwicklung einer Methode für die direkte Bestimmung von $PGF_{2\alpha}$ und PGFM Konzentrationen in Plasma erbrachte eine deutliche Vereinfachung der Prostaglandinbestimmung.In allen Radioimmuntests traten keine Reagenzienleerwerte auf.Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Methoden waren gut. Die Spezifität und Präzision der Routinemessung wurden durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie validiert (HPLC-RIA).

Für die Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Messung wurde ein Antikörper produziert und charakterisiert.

Die Halbwertszeit der 13,14-dihydro-15-keto-Metaboliten nach Infusion der primären Prostaglandine $PGF_{2\alpha}$ und PGE_2 wurde beim Rind bestimmt und beträgt ca 4 bzw. 5 Minuten. Diese Metaboliten wurden daraufhin als brauchbare Anzeiger der Sekretion der primären Prostaglandine betrachtet. Die Infusion sowohl von $PGF_{2\alpha}$,als auch von PGE_2 löste einen Anstieg der Ocytocinkonzentrationen im Plasma aus.Unter dem Einfluß der PGE_2 Infusion sank die Progesteronkonzentration,im Gegensatz zur $PGF_{2\alpha}$ Infusion,nicht ab.

Die Bestimmung der $PGF_{2\alpha}$ und PGFM Konzentrationen im Plasma bei drei Braunviehkalbinnen während des physiologischen Zyklus erbrachte an den Zyklustagen 1-16 relativ geringe Schwankungen auf niedrigem Niveau,die an den Zyklustagen 17 - 19 von massiven $PGF_{2\alpha}$ Freisetzungen abgelöst wurden

(PGFM entsprechend).Danach fiel die Konzentration wieder rasch ab.Gleichzeitig mit den $PGF_{2\alpha}$ Freisetzungen sank die Progesteronkonzentration deutlich ab (Luteolyse).

Durch passive Immunisierung mit Ocytocinantikörpern konnte bei 5 Braunviehkalbinnen die Luteolyse nicht verhindert werden.Die Auswertung der $PGF_{2\alpha}$ Plasmakonzentrationen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe.Eine Zyklusverlängerung konnte nicht abgesichert werden.

Ocytocininjektionen (3 x 1 I.E. Ocytocin) an verschiedenen Zyklustagen ergaben eine Abhängigkeit der dadurch ausgelösten $PGF_{2\alpha}$ Sekretion vom Zyklusstadium.Am Zyklustag 6 wurde keine $PGF_{2\alpha}$ Sekretion ausgelöst,wohl aber an den Tagen 13,16,17 und 18 .

Die $PGF_{2\alpha}$ Konzentrationen in Blutproben aus der Vena cava caudalis differierten auf Grund des Einflusses der Katheterposition zwischen den einzelnen Tieren beträchtlich. Ein Vergleich der absoluten Werte war daher bei den durchgeführten Versuchen nicht möglich.
Vergleichsmessungen von $PGF_{2\alpha}$ und PGFM Konzentrationen in der Vena cava caudalis gaben deutliche Hinweise,daß $PGF_{2\alpha}$ vorzugsweise im Uterus synthetisiert wird.

Summary

Analytical investigations about the
primary prostaglandins $F_{2\alpha}$ and E_2
and its 13,14-dihydro-15-keto-metabolites
in the bovine reproductive cycle

For the determination of the prostaglandins $PGF_{2\alpha}$, PGFM, PGE_2 and PGEM in plasma radioimmunoassays were developed. The presented procedures allow a valid determination and the detection limits amounted to 40 pmol $PGF_{2\alpha}$/ml, 60 fmol PGFM/ml, 40 fMol PGEM/ml and 115 fmol PGE_2/ml plasma. The prostaglandin determinations were simplified by the development of direct assays for $PGF_{2\alpha}$ and PGFM. In all radioimmunoassays no procedural blanks were measured and the precision and reproducibility were good. The specifity and precision were validated by high performance liquid chromatography (HPLC-RIA).

An antiserum for assaying $PGF_{2\alpha}$ was produced and characterized.

After infusion of $PGF_{2\alpha}$ and PGE_2 the biological half-live period of the 13,14-dihydro-15-keto-metabolites in bovine plasma was measured and amounted to 4-5 minutes. Hence these metabolites are suitable markers for the secretion of primary prostaglandins. Oxytocin was elevated after infusion of both $PGF_{2\alpha}$ and also PGE_2. Progesterone levels decreased after $PGF_{2\alpha}$ infusion, but were not affected by PGE_2.

During days 1-16 of the normal cycle of three heifers (brown swiss) $PGF_{2\alpha}$ and PGFM levels in plasma showed little variations on a low level, whilst on days 17-19 substantial

secretions of $PGF_{2\alpha}$ and PGFM were observed,followed by low levels on the next days.Contemporary to $PGF_{2\alpha}$ secretion progesterone dropped to low levels (luteolysis).

In 5 heifers luteolysis could not be prevented by passive immunization against oxytocin.Comparing treatment and control group no sigificant difference of $PGF_{2\alpha}$ levels was found and also the prolongation of cycles after treatment were insignificant.

$PGF_{2\alpha}$ secretions responding to injections of 3 x 1 I.U. oxytocin showed a dependency to the stage of the cycle. On day 6 no prostaglandin was released,contrary to days 13,16,17 and 18 .

Comparing individuals the concentrations of $PGF_{2\alpha}$ in blood samples from the vena cava caudalis differed considerably due to varying positions of the catheder.Therefore a comparison of absolute $PGF_{2\alpha}$ concentrations was not possible in the performed experiments.
Comparative measurements of $PGF_{2\alpha}$ and PGFM in samples from the vena cava caudalis gave further evidence that $PGF_{2\alpha}$ is preferably synthesized in the uterus.

VII,Literaturverzeichnis

Alwachi S.N.,Bland K.P.,Poyser N.L.
Prostaglandin production by the progesterone-dominated sheep uterus
Prostaglandins and Medicine 6,571-576 (1981)

Armstrong D.T.,Hansel W.
Alterations of the bovine estrous cycle with oxytocin
J. Dairy Science 42,533-542 (1959)

Axen U.
N,N'-Carbonyldiimidazol as coupling reagent for the preparation of bovine serum albumin conjugates
Prostaglandins 5,45-47 (1973)

Baird D.T.,Land R.B.
Division of the uterine vein and the function of the adjacent ovary in the ewe
J. Reprod. Fert. 33,393-397 (1973)

Bergström S.,Carlson L.A.,Weeks J.R.
The prostaglandins,a family of biologically active lipids
Pharmacol. Rev. 20,1-48 (1968)

Bito L.Z.,Baroody R.A.,Reitz M.E.
Dependence of pulmonary prostaglandin metabolism on carrier-mediated transport processes.
Amer. Journ. Physiol. 232 (1977)

Caldwell B.V.,Burstein S.,Brock W.A.Speroff L.
Radioimmunoassay of the F prostaglandins
J. of Clin. Endocrin. and Metab. 33,171-175 (1971)

Chan W.Y.,Hruby V.J.,Vigneaud du V.
Effects of magnesium ion and oxytocin inhibitors on the uterotonic activity of oxytocin and prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$
J. Pharmacol. Exp. Ther. 190,77-87 (1974)

Corey E.J.
Studies on the total synthesis of prostaglandins
Ann. N.Y. Acad. Sci. 180,24-37 (1971)

Coudert S.P.,Phillips G.D.,Faiman C.,Chernecki W.,Palmer M.
A study of the utero-ovarian circulation in sheep with reference to local transfer between venous and arterial blood
J. Reprod. Fert. 36,319-331 (1974)

Demers L.M.,Brennecke S.P.,Mountford L.A.,Brunt J.D.,Turnbull A.C.
Development and validation of a radioimmunoassay for prostaglandin E_2 metabolite levels in plasma
J. of Clin. Endocrin. and Metab. 57,101-106 (1983)

Eckert H.G.,Strecker H.
Prinzip und Anwendung des Radioimmunoassays
Naturwissenschaften 65,245-249 (1978)

Edqvist L.E.,Kindahl H.,Stabenfeld G.
Release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ during the bovine peripartal period
Prostaglandins 16,111-119 (1978)

Einer-Jensen N.,McCracken J.A.
The effect of prostaglandine $F_{2\alpha}$ on the counter-current transfer of 85-krypton in the ovarian pedicle of the sheep
Prostaglandins 13,763-775 (1977)

Ellendorff F.,Forsling M.,Parvizi N.,Williams H.
Plasma oxytocin and vasopressin concentrations in response to prostaglandin injection into the pig
J. Reprod. Fert. 56,573-577 (1979)

Erlanger B.F.,Borek F.,Beiser S.M.,Liebermann S.
Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone
The J. of biological chemistry 228,713-727 (1957)

Euler U.S. von
Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes
Klin. Wochenschr. 33,1182-1183 (1935)

Fairclough R.J.,Hunter J.T.,Welch R.A.S.
Peripheral plasma progesterone and utero-ovarian prostaglandin F concentrations in the cow around parturition
Prostaglandins 9,901-912 (1975)

Fairclough R.J.,Smith J.F.,McGowan L.T.
Prolongation of the oestrous cycle in cows and ewes after passive immunization with PGF antibodies
J. Reprod. Fert. 62,213-219 (1982)

Flint A.P.F.,Sheldrick E.L.
Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin
Nature 297 587-588 (1982)

Flower R.J.
Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis
Pharmacol. Rev. 26,33-67 (1974)

Flower R.J.,Blackwell G.J.
The importance of phospholipase A_2 in prostaglandin biosynthesis
Biochem. Pharmacol. 25,285-291 (1976)

Ginther O.L.,Del Campo C.H.
Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus;areas of close apposition between the ovarian artery and vessels which contain uterine venous blood in sheep
Am. J. Vet. Res. 34,1387-1393 (1973)

Ginther O.J.,Del Campo C.H.
Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus : cattle
Am. J. Vet. Res. 35,193-203 (1974)

Ginther O.J.,Woody C.O.,Mahajan S.,Janakiraman K.,Casida L.E.
Effect of oxytocin administration on the oestrous cycle of unilaterally hysterectomized heifers
J. Reprod. Fert. 14,225-229 (1967)

Goldblatt M.W.
A depressor substance in seminal fluid
Chem. Ind. N.Y. 52,1056-1057 (1933)

Granström E.,Fitzpatrick F.A.,Kindahl H.
Radioimmunologic determination of 15-keto-13,14-dihydro-PGE_2 : A method for its stable degradation product,11-deoxy-15-keto-13,14-dihydro-11β,16ε-cyclo-PGE_2
Methods in Enzymology 86,306-320 (1982a)

Granström E.,Kindahl H.,Swahn M.-L.
Profiles of prostaglandin metabolites in the human circulation - Identification of late-appearing,long-lived products
Biochimica et Biophysica Acta 713,46-80 (1982b)

Granström E.,Kindahl H.
Radioimmunoassay of the major plasma metabolite of $PGF_{2\alpha}$,15-keto-13,14-dihydro-$PGF_{2\alpha}$
Methods in Enzymology 86,320-339 (1982a)

Granström E.,Kindahl H.
Species differences in circulating prostaglandin metabolites.Relevance for the assay of prostaglandin release
Biochimica et Biophysica Acta 713,555-569 (1982b)

Harley G.W.
Native african Medicine with special reference to its practice in the Manu tribe of Liberia
Cass. London (1970)

Hoffmann B.,Kyrein H.J.,Ender M.C.
An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma
Hormone Research 4,302-310 (1973)

Hoppen H.O.
Prostaglandine
Endokrinologie des Kindes- und Jugendalters S. 317-341
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1982)

Jobke A.,Peskar B.A.
On the specifity of antisera against prostaglandins A_2 and E_2
Febs Letters 37,192-196 (1973)

Johnson C.T.
Induction of parturition in cattle
Acta vet. scand. suppl. 77,311-320 (1981)

Kindahl H.
Radioimmunoassays for prostaglandins,prostaglandin metabolites and thromboxanes
Dissertation,Dep. of Chem.,Karolinska Institutet,Stockholm (1978

Kindahl H.
Release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ during the oestrous cycle
Acta vet. scand. suppl. 77,143-158 (1981a)

Kindahl H.
Assay methods for prostaglandins
Acta vet. scand. suppl. 77,29-38 (1981b)

Kindahl H.,Edqvist L.-E.,Bane A.,Granström E.
Blood levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin $F_{2\alpha}$ during the normal oestrous cycle and early pregnancy in heifers
Acta Endocrin. 82,134-149 (1976a)

Kindahl H.,Edqvist L.-E.,Granström E.,Bane A.
The release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ as reflected by 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin $F_{2\alpha}$ in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers
Prostaglandins 11,871-878 (1976b)

Kindahl H.,Granström E.,Edqvist L.-E.
Progesterone and 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin $F_{2\alpha}$ levels in peripheral circulation after intrauterine iodine infusions in cows
Acta vet. scand. 18,274-286 (1977)

Kindahl H.,Lindell J.-O.
Effect of hysterectomy on the postpartum prostaglandin levels in the cow
Acta vet. scand. 23,144-146 (1982)

Kindahl H.,Lindell J.-O.,Edqvist L.-E.
On the control of prostaglandin release during the bovine estrous cycle.Effects of progesterone implants
Prostaglandins 18,813-819 (1979)

Kopp H.G.,Vetter W.,Vitins P.,Siegenthaler W.
Problems connected with the production of highly specific antisera against prostaglandin E_2 (PGE_2) and prostaglandin A_2 (PGA_2) for radioimmunoassay
Radioimmunoassay and related procedures in medicine 1977 I
IAEA,Wien,57-67 (1978)

Lamond D.R.,Drost M.
Blood supply to the bovine ovary
J. Animal Science 38,106-112 (1974)

Lamond D.R.,Tomlinson R.V.,Drost M.,Henricks D.M.,
Jöchle W.
Studies of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the cow
Prostaglandins 4,269-283 (1973)

Lindell J.-O.,Kindahl H.,Jansson L.,Edqvist L.-E.
Post-partum release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and uterine involution in the cow
Theriogenology 17,237-245 (1982)

Lukaszewska J.,Hansel W.
Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow
J. Reprod. Fert. 59,485-493 (1980)

McCracken J.A.,Schramm W.,Barcikowsky B.,Wilson L.
The identification of prostaglandin $F_{2\alpha}$ as a uterine luteolytic hormone and the hormonal control of its synthesis
Acta vet. scand. suppl. 77,71-88 (1981)

Milvae R.A.,Hansel W.
Concurrent uterine venous and ovarian arterial prostaglandin F concentrations in heifers treated with oxytocin
J. Reprod. Fert. 60,7-15 (1980)

Milvae R.A.,Hansel W.
Luteolytic Effect of 13,14-dihydro-$PGF_{2\alpha}$ in heifers
J. Reprod. Fert. 67,203-207 (1983)

Morris H.G.,Sherman N.A.,Shepperdson T.T.
Variables connected with radioimmunoassay of prostaglandins in plasma
Prostaglandins 21,771-788 (1981)

Newcomb R.,Booth W.D.,Rowson L.E.A.
The effect of oxytocin treatment on the levels of prostaglandin F in the blood of heifers
J. Reprod. Fert. 49,17-24 (1977)

Orczyk G.P.,Behrman H.R.
Ovulation blockade by aspirin or indomethacin - in vivo evidence for a role of prostaglandin in gonadropin secretion
Prostaglandins 1,2-11 (1972)

Rao B.
General introduction and comments
Prostaglandins and reproduction (ed. Karim S.M.M.)
MTP,Lancaster (1975)

Riefling B.
Prinzipien der Prostaglandinsynthese (1)
Kontakte (Merck) 2,26-39 (1983)

Roberts J.S.,Barcikowsky B.,Wilson L.,Skarnes R.C.,McCracken J.A.
Hormonal and related factors affecting the release of Prostaglandin $F_{2\alpha}$ from the uterus
J. Steroid Biochemistry 6,1091-1097 (1975)

Rolle M.,Mayr A.
Mikrobiologie,Infektions- und Seuchenlehre
Ferdinand Enke Verlag (1978)

Rome L.H.,Lands W.E.M.
Aspirin as a quantitative acetylating reagent for the fatty acid oxygenase that forms prostaglandins
Prostaglandins 11,22-29 (1976)

Samuelsson B.,Borgeat P.,Hammarström S.,Murphy R.C.
Leukotrienes : a new group of biological active compounds
Adv. Prostaglandine Thromboxane Res. 6,1-18 (1980)

Samuelsson B.,Granström E.,Green K.,Hamberg M.
Prostaglandins
Annu. Rev. Biochem. 44,669-695 (1975)

Scatchard G.
The attractions of proteins for small molecules and ions
Am. N.Y. Acad. Sci. 51,660 (1949)

Schams D.
Oxytocin determination by radioimmunoassay-
III Improvement to subpicogram sensitivity and application to cyclic blood levels in cattle
Acta Endocrin. 103,180-183 (1983)

Schams D.,Karg H.
LH - Bestimmung im Blutserum vom Rind unter besonderer Berücksichtigung des Brunstzyklus
Acta Endocrin. Copenh. 61,96 (1969)

Schams D.,Karg H.
Hormonal responses following treatment with different luteolytic active prostaglandin-analogues for cycle regulation in cattle
Internationales Symposium : Steroids in Animal Production
Warschau (1980)

Schams D.,Karg H.
Hormonal responses following treatment with different prostaglandin analogues for estrous cycle regulation in cattle
Theriogenology 17,499-513 (1982)

Schams D.,Prokopp S.,Barth D.
The effect of active and passive immunization against oxytocin on ovarian cyclicity in ewes
Acta Endocrin. 103,337-344 (1983)

Schams D.,Schmidt-Polex B.,Kruse V.
Oxytocin determination by radioimmunoassay in cattle
Acta Endocrin. 92,258-270 (1979)

Schlegel W.,Raptis S.
A reliable method for generating antibodies against pancreozymin,secretin and gastrin
Clin. Chim. Acta 73,439-444 (1976)

Schlegel W.,Urdinola J.,Schneider H.P.G.
Radioimmunoassay for 13,14-dihydro-15-ketoprostaglandin $F_{2\alpha}$ and its application in normo-and anovulatory women
Acta Endocrin. 100,98-104 (1982)

Schrör K.
Prostaglandine und verwandte Verbindungen
Bildung,Funktion und pharmakologische Beeinflussung
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1983)

Stehle R.S.
Physical chemistry,stability,and handling of prostaglandins E_2,$F_{2\alpha}$,D_2 and I_2 : A critical summary
Methods in Enzymology 86,436-458 (1982)

Stylos W.A.,Rivetz B.
Preparation of Specific Antiserum against Prostaglandin A_2
Prostaglandins 2,104-113 (1972)

Thomas C.M.G.,Van den Berg R.J.,De Koning Gans H.J.,
Lequin R.M.
Radioimmunoassays for prostaglandins.II.Measurement of prostaglandin E_2 and the 13,14-dihydro-15-keto metabolites of the E and F Series.Describtion of a reliable technique with a universal applicability
Prostaglandins 15,849-855 (1978)

Tuvemo T.,Strandberg K.
Effects and interaction of oxygen and prostaglandins on the tone of the isolated human umbilical artery
J. Med. Sci. (Uppsala) 80,131-134 (1975)

Walters D.L.,Schallenberger E.
Kurzzeitsekretion von Östradiol 17-β und Progesteron beim Rind - Vergleich der Konzentrationen im Blutplasma der V. cava und V. jugularis
Wien. tierärztl. Mschr. 70,247-248 (1983)

Walters D.L.,Schallenberger E.
Pulsatile secretion of estradiol (E_2) and progesterone (P_4) during the estrous cycle of the cow
J. of Steroid Biochem. 17,Abstract 270 (1982)

Webb R.,Mitchell M.D.,Falconer J.,Robinson J.S.
Temporal relationships between peripheral plasma concentrations of oxytocin,progesteron and 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin $F_{2\alpha}$ during the oestrous cycle and early pregnancy in the ewe
Prostaglandins 22,443-451 (1981)

Weinheimer A.J.,Spraggins R.L.
Chemistry of coelenterates
Tetrahedron Lett. 59,5185-5188 (1969)

Youssefnejadian E.,Walker E.,Sommerville I.F.,Craft I.
Simple direct radioimmunoassay of the F prostaglandins
Prostaglandins 6,22-31 (1974)

VIII, Tabellenanhang

Die Tabellen im Tabellenanhang tragen die im Textteil angegebenen Nummern.
Auf Grund der immensen Probenzahlen konnten nicht alle Meßwerte in diesem Rahmen wiedergegeben werden. Bevorzugt wurden die Tabellen der Tierversuche wiedergegeben, bei denen die Blutproben möglichst in vollständiger Zahl gezogen wurden. Die nicht im Tabellenanhang aufgeführten Ergebnisse sind im Institut für Physiologie der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan der Technischen Universität München zugänglich. Ein Teil dieser Meßergebnisse ist aus den Abbildungen ersichtlich.
Die Auswertung der Plasmaproben erfolgte im Rahmen einer Teamarbeit am Institut.
Die Prostaglandinmessungen wurden vom Verfasser und Frl. B. Ziegltrum (TA) durchgeführt.
Die Ocytocinmessungen führte H.-J. Breitinger aus.
Progesteron wurde unter Leitung von Professor D. Schams bestimmt.

Tab. 21 : Kreuzreaktion des $PGF_{2\alpha}$ Antiserum Pools A-5

$PGF_{2\alpha}$ Zusatz pMol/ml	$PGF_{2\alpha}$ %	Zusatz pMol/ml	PGFM %	PGE_2 %	PGA_2 %	Zusatz pMol/ml	PGEM %	PGAM %
0,004	93,6	0,2	97,8	104,9	102,7	0,16	101,2	96,4
0,008	89,2	0,4	98,4	100,9	108,2	0,32	102,2	94,9
0,016	76,6	0,8	96,3	100,6	101,2	0,63	100,9	95,8
0,032	64,9	1,6	97,8	99,5	101,2	1,25	102,2	97,3
0,063	47,2	3,2	96,8	102,8	103,9	2,50	101,9	103,3
0,125	33,1	6,3	98,7	98,2	100,9	5,00	103,6	98,9
0,250	23,1	12,5	94,6	94,6	98,7	10,00	106,8	96,6
0,500	17,4	25,0	91,0	91,3	96,1	20,00	100,8	99,0
1,000	13,0	50,0	81,6	86,1	89,9	-	-	-

% gibt die relative Bindung im Vergleich zum 0-Wert an.
Gesamtaktivität des ^3H-$PGF_{2\alpha}$ ca. 4700 cpm
Nicht-spezifische-Bindung ca. 100 cpm

Tab. 22 : Scatchard Plot
$PGF_{2\alpha}$ Antiserum Pool A-5

Frei cpm	gebunden cpm	gebunden pM	gebunden/ frei
14965	3700	46,03	0,25
8395	3303	41,09	0,39
4564	2999	37,31	0,66
2998	2265	28,18	0,76
1400	1731	21,53	1,24
779	1194	14,85	1,53
538	794	9,88	1,48
312	511	6,36	1,64
177	368	4,58	2,08
140	224	2,79	1,60
90	150	1,87	1,67

Berechnet auf 0,5 ml Antiserumendverdünnung
1000 cpm entsprechen 6,22 fMol oder 12,44 pM

Tab. 23 : Vergleich RIA Direkttest - nach Vorreinigung
Plasmaproben "Rolfi",Zyklustag 18,19

Zyklustag	Uhrzeit	$PGF_{2\alpha}$ Direktt. fMol/ml	$PGF_{2\alpha}$ nach Vorr. fMol/ml	PGFM Direktt. fMol/ml	PGFM nach Vorr. fMol/ml
18	21.00	1261	1593	2453	2541
	24.00	294	398	312	411
19	3.00	516	639	480	646
	6.00	1209	1723	2220	2449
	9.00	348	555	562	734
	15	294	307	314	608
	30	321	473	354	543
	45	263	500	443	728
	10.00	307	500	425	573
	15	325	382	532	679
	30	349	482	486	578
	45	401	411	513	617
	11.00	-	-	-	-
	15	413	389	545	701
	30	544	879	777	770
	45	664	853	850	1051
	12.00	1001	1217	1371	1511
	15	2496	3083	2582	2286
	30	2120	2942	1813	2454
	45	1774	2677	2247	2870
	13.00	2619	3627	2895	3651
	15	2433	3235	2950	3308
	30	-	-	-	-
	45	3410	4191	3693	3937
	14.00	7477	9522	5388	5814
	15.00	996	1358	1887	1994
	18.00	223	348	187	279

Tab. 24 : 1.PGFM Halbwertszeitversuch

Zeit in Minuten	PGFM fMol/ml	$PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	Ocytocin pg/ml	Progesteron ng/ml
0	145	-	1,5	6,8
5	139	205	1,5	6,8
10	149	-	1,6	6,6
15	145	-	1,4	6,9
20	151	145	1,1	6,8
25	172	-	1,5	7,4
30	230	87	1,6	7,6
Infusion				
31	11890	3592	1,2	7,6
32	23460	4659	6,6	8,1
33	24130	4783	12,4	8,1
34	30764	4257	13,8	9,1
35	39183	5101	16,6	8,1
37	41742	4559	26,7	7,0
39	40906	4881	26,6	6,4
41	48299	5727	24,8	6,4
43	41666	4559	33,3	5,9
45	43947	5298	37,1	5,3
50	46044	5087	42,3	4,7
55	47081	6232	36,6	4,9
60	55605	6254	40,7	4,5
Infusionsende				
61	33018	584	30,2	4,5
62	20024	477	36,1	4,7
63	16778	476	36,1	4,5
64	10216	390	34,2	4,6
65	9679	508	28,9	4,5
67	6957	363	25,4	4,5
69	6123	311	20,1	4,5
71	3966	234	13,9	4,5
73	3725	370	10,5	4,3
75	3402	284	10,3	4,9
80	1721	187	11,3	4,9
85	1807	100	8,9	4,5
90	1356	214	6,8	4,5
95	862	-	6,1	4,5
100	611	-	4,9	3,6
105	701	-	3,8	4,2
110	587	184	3,2	4,0
120	210	-	1,9	3,8
130	381	190	1,8	4,0
140	380	-	1,9	4,7
150	337	-	1,7	4,9
160	325	-	1,8	6,8
170	244	128	1,4	6,8
180	268	87	1,6	6,2
190	241	-	2,0	6,6

Tab. 25 : 2.PGFM Halbwertszeitversuch

Zeit in Minuten	PGFM fMol/ml	Progesteron ng/ml
0	249	6,6
5	262	6,7
10	192	6,7
15	196	5,8
20	179	5,4
25	224	6,2
Infusion		
26	264	6,5
27	515	6,3
28	721	6,2
29	921	5,6
30	1100	5,7
32	1062	5,4
34	1195	5,3
36	1319	5,8
38	1125	6,2
40	1174	6,0
45	1205	5,8
50	1317	5,1
55	1120	4,1
Infusionsende		
55,5	1136	5,2
56	1043	5,3
57	945	4,5
58	745	5,3
59	583	4,7
60	527	4,7
62	365	4,3
64	335	4,0
66	230	4,2
68	246	4,3
70	263	4,2
75	180	3,5
80	254	3,9
85	258	4,0
90	162	4,5
95	170	4,4
105	121	4,2
115	107	5,9
125	96	5,6
135	121	5,6
145	120	5,8
155	127	5,3
165	109	5,3
175	131	5,4
185	94	5,5

Tab. 26 : PGEM Halbwertszeitversuch

Zeit in Minuten	PGEM fMol/ml	PGE_2 fMol/ml	Ocytocin pg/ml	Progesteron ng/ml	PGFM fMol/ml
0	281	-	2,3	4,1	399
10	149	-	2,6	4,5	470
20	210	-	2,7	4,1	419
30	163	-	2,1	4,7	323
40	-	-	2,1	5,9	391
50	160	-	3,4	6,9	301
Infusion					
61	5181	420	2,8	7,4	673
64	7438	681	6,5	6,2	780
66	9305	3595	20,7	6,2	956
70	14429	910	49,6	6,4	994
71,5	12670	2234	59,0	7,3	1036
Infusionsende					
72,5	11119	213	49,6	6,5	899
73,5	6923	208	42,4	6,9	815
74,5	6531	281	32,9	6,2	732
75,5	5259	175	29,8	5,7	679
76,5	4331	77	24,7	6,2	649
78,5	3215	126	20,2	6,4	601
80,5	2527	65	16,4	5,3	601
82,5	1955	49	13,4	5,5	631
84,5	1524	-	11,3	4,2	435
86,5	1145	134	10,9	4,1	429
91,5	819	73	5,9	4,1	465
96,5	930	-	5,6	3,3	474
101,5	578	46	4,6	3,7	536
111,5	436	78	3,6	3,9	458
121,5	341	48	2,8	3,6	431
131,5	434	-	3,8	4,8	369
151,5	85	56	3,1	4,3	393
171,5	314	-	3,3	4,5	412
191,5	-	-	3,5	6,6	152

Tab. 27 (1) : Kalbin "Rolfi" - $PGF_{2\alpha}$, PGFM, Progesteron, LH

Zyklustag	Uhrzeit	$PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	PGFM fMol/ml	Progesteron ng/ml	LH ng/ml
9	7.15	450	393	27,4	
10	10.30	564	359	19,1	
11	9.00	583	476	21,0	
	15	415	362	25,2	
	30	358	315	21,7	
	45	446	267	35,7	
	10.00	467	334	33,6	
	15	495	334	25,2	
	30	464	333	20,3	
	45	480	326	33,6	
	11.00	387	321	37,1	
	15	474	359	30,1	
	30	353	348	17,5	
	45	440	357	21,0	
	12.00	397	372	19,6	
	15	451	373	37,8	
	30	349	353	25,9	
	45	456	367	35,7	
	13.00	423	371	31,5	
	15	390	331	31,5	
	30	855	453	25,2	
	45	444	356	23,8	
	14.00	415	335	12,6	
	15.00	437	479	25,9	
	18.00	370	397	22,6	
	21.00	477	419	29,4	
	24.00	363	406	28,7	
12	3.00	490	403	27,3	
	6.00	499	383	20,5	
	9.00	387	358	24,6	
	12.00	504	549	37,6	
	15.00	576	483	24,8	
	18.00	427	473	31,5	
	21.00	587	582	52,0	
	24.00	605	624	35,5	
13	3.00	555	588	34,2	
	6.00	610	531	27,3	
	9.00	605	735	56,0	
	15	594	653	43,4	
	30	705	770	37,1	
	45	-	-	-	
	10.00	573	588	18,2	
	15	627	751	32,2	
	30	635	677	23,8	
	45	611	678	23,8	
	11.00	653	820	22,4	
	15	505	652	24,5	
	30	828	878	31,5	
	45	625	670	30,8	
	12.00	444	722	28,7	
	15	588	758	32,1	
	30	670	900	45,6	
	45	663	772	26,5	

Tab. 27 (2) : Kalbin "Rolfi" - $PGF_{2\alpha}$, PGFM, Progesteron, LH

Zyklustag	Uhrzeit	$PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	PGFM fMol/ml	Progesteron ng/ml	LH ng/ml
13	13.00	608	660	29,3	
	15	583	655	25,2	
	30	717	616	21,8	
	45	604	622	57,2	
	14.00	553	651	38,8	
	15.00	789	839	64,7	
	18.00	696	536	76,6	
	21.00	759	746	100,0	
	24.00	784	628	38,3	
14	3.00	684	637	51,0	
	6.00	473	522	51,0	
	9.00	467	597	34,0	
	15	627	725	61,7	
	30	650	763	46,4	
	45	525	707	38,1	
	10.00	950	834	59,6	
	15	538	713	85,8	
	30	728	597	46,8	
	45	499	589	57,2	
	11.00	806	710	50,4	
	15	866	970	70,9	
	30	851	745	39,5	
	45	724	731	43,6	
	12.00	748	743	53,2	
	15	623	558	47,7	
	30	846	807	49,0	
	45	582	635	39,5	
	13.00	713	713	34,1	
	15	674	804	32,7	
	30	718	688	40,9	
	45	675	783	62,7	
	14.00	727	830	64,0	
	15.00	677	885	48,0	
	18.00	651	575	48,0	
	21.00	798	842	59,0	
	24.00	807	891	53,0	
15	3.00	577	525	41,0	
	6.00	607	654	51,0	
	9.00	524	807	55,8	
	15	385	600	71,1	
	30	437	723	39,1	
	45	344	696	44,7	
	10.00	393	648	40,5	
	15	307	602	37,7	
	30	443	564	46,0	
	45	408	553	53,0	
	11.00	430	566	29,3	
	15	353	550	39,1	
	30	551	584	69,8	
	45	376	478	44,6	
	12.00	505	540	65,6	
	15	329	565	58,6	
	30	521	551	58,6	
	45	352	608	64,2	

Tab. 27 (3) : Kalbin "Rolfi" - $PGF_{2\alpha}$, PGFM, Progesteron, LH

Zyklustag	Uhrzeit	$PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	PGFM fMol/ml	Progesteron ng/ml	LH ng/ml
15	13.00	480	696	62,8	
	15	413	730	40,5	
	30	568	750	48,8	
	45	438	675	54,4	
	14.00	520	595	43,2	
	15.00	502	669	42,9	
	18.00	534	682	63,0	
	21.00	-	-	-	
	24.00	-	-	119,0	
16	3.00	770	1111	64,0	
	6.00	679	93	93,0	
	9.00	560	1833	46,7	
	15	324	607	42,4	
	30	485	677	48,2	
	45	365	520	43,8	
	10.00	399	687	93,5	
	15	388	655	119,7	
	30	515	675	58,4	
	45	-	794	62,9	
	11.00	830	609	57,0	
	15	455	785	68,6	
	30	622	786	59,9	
	45	388	678	49,6	
	12.00	602	913	57,0	
	15	751	1007	26,3	
	30	643	904	54,0	
	45	-	-	-	
	13.00	-	-	-	
	15	1019	1685	49,6	
	30	1293	1616	35,0	
	45	761	1201	62,8	
	14.00	795	1186	90,5	
	15.00	-	-	-	
	18.00	376	791	89,5	
	21.00	552	942	47,0	
	24.00	359	1007	50,0	
17	3.00	395	877	65,0	
	6.00	299	674	43,0	
	9.00	333	795	24,9	
	15	335	677	23,4	
	30	379	710	26,3	
	45	204	656	39,5	
	10.00	290	767	43,8	
	15	87	547	27,8	
	30	328	614	30,7	
	45	238	627	24,9	
	11.00	311	666	112,4	
	15	336	721	55,5	
	30	399	770	38,0	
	45	296	919	57,7	
	12.00	305	774	64,9	
	15	175	1098	221,9	
	30	288	739	49,0	
	45	184	720	54,8	

Tab. 27 (4) : Kalbin "Rolfi" - $PGF_{2\alpha}$,PGFM,Progesteron,LH

Zyklustag Uhrzeit	$PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	PGFM fMol/ml	Progesteron ng/ml	LH ng/ml
17 13.00	256	657	53,4	
15	257	566	41,8	
30	287	647	54,8	
45	243	674	47,6	
14.00	370	683	51,9	
15.00	459	1036	69,6	
18.00	397	691	62,0	
21.00	502	1416	85,0	
24.00	1671	2347	77,0	
18 3.00	987	2289	75,0	
6.00	445	741	63,0	
9.00	208	700	38,9	
15	198	691	38,9	
30	420	747	41,8	
45	142	765	41,8	
10.00	257	770	27,4	
15	211	792	28,8	
30	247	899	33,2	
45	186	934	41,8	
11.00	345	1045	46,1	
15	252	780	25,9	
30	293	858	25,9	
45	168	845	25,9	
12.00	319	1060	33,2	
15	231	891	25,9	
30	363	1226	23,1	
45	252	1103	20,2	
13.00	367	996	30,3	
15	196			
45	241	945	30,3	
14.00	371	1056	30,3	
15.00	557	1295	51,1	
18.00	561	1059	44,0	
21.00	1838	4025	26,0	
24.00	378	640	11,2	
19 3.00	950	1173	6,9	
6.00	1855	3650	6,2	
9.00	728	1310	5,9	
15	546	1065	5,4	
30	544	939	4,8	
45	568	1158	6,3	
10.00	529	936	5,3	
15	603	1084	5,6	
30	572	1095	4,6	
45	510	1111	5,6	
11.00	744	1310	5,7	
15	622	1317	4,9	
30	901	1648	5,5	
45	1202	2034	4,6	
12.00	1913	2676	4,4	
15	3494	4025	4,4	
30	3432	3874	4,0	
45	2735	3959	3,9	

Tab. 27 (5) : Kalbin "Rolfi" - $PGF_{2\alpha}$,PGFM,Progesteron,LH

Zyklustag / Uhrzeit	$PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	PGFM fMol/ml	Progesteron ng/ml	LH ng/ml
19 13.00	3849	4451	4,0	
15	3399	4598	3,5	
30	6624	4925	3,6	
45	4254	4997	3,5	
14.00	8180	6520	4,0	
15.00	1843	2616	4,7	
18.00	492	628	2,9	
21.00	4053	3947	2,8	
24.00	1073	1991	2,9	
20 3.00	524	685	2,3	
6.00	1166	1840	2,2	
9.00	830	1410	1,5	
15	683	1212	1,5	
30	527	1070	1,6	
45	523	862	1,6	
10.00	558	805	1,4	
15	437	652	1,2	
30	635	732	1,6	
45	419	603	1,3	
11.00	392	589	1,3	
15	300	488	1,5	
30	354	547	1,4	
45	330	526	1,3	
12.00	504	665	1,3	
15	355	623	1,2	
30	437	686	1,1	
45	383	554	1,3	
13.00	535	648	1,0	
15	414	534	1,0	
30	720	748	1,3	
45	587	560	1,2	
14.00	718	556	1,5	
15.00	368	732	2,5	
18.00	283	462	1,7	
21.00	311	583	1,6	
24.00	332	528	2,0	
21=0 3.00	319	538	2,0	5,4
6.00	287	442	1,7	3,2
9.00	372	430	1,6	4,1
12.00	380	433	1,7	3,0
15.00	345	503	1,9	3,3
18.00	198	446	1,5	10,0
21.00	219	423	1,3	13,3
24.00	347	419	1,5	16,6
1 3.00	347	418	1,2	10,3
6.00	355	526	1,3	5,4
9.00	344	394	1,2	3,7
12.00	329	362	1,2	5,6
15.00	344	435	1,4	5,3
18.00	366	391	1,2	3,7
21.00	251	403	1,2	4,3
24.00	300	380	1,3	4,6

Tab. 27 (6) : Kalbin "Rolfi" - $PGF_{2\alpha}$,PGFM,Progesteron,LH

Zyklustag	Uhrzeit	$PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	PGFM fMol/ml	Progesteron ng/ml	LH ng/ml
2	3.00	353	402	1,1	
	6.00	234	357	1,1	
	9.00	289	331	0,5	
	15	201	459	0,5	
	30	230	407	0,4	
	45	235	350	0,3	
	10.00	300	354	0,5	
	15	234	423	0,4	
	30	332	508	0,5	
	45	242	387	0,4	
	11.00	272	407	0,5	
	15	204	471	0,6	
	30	364	377	0,4	
	45	175	363	1,1	
	12.00	261	459	0,9	
	15	222	328	0,8	
	30	260	424	0,8	
	45	164	419	0,7	
	13.00	345	399	0,7	
	15	262	479	1,0	
	30	464	465	0,7	
	45	347	507	0,8	
	14.00	354	526	0,7	
	15.00	1566	765	1,0	
	18.00	1245	908	1,1	
	21.00	675	891	0,8	
	24.00	534	564	0,9	
3	3.00	449	436	0,9	
	6.00	470	380	1,1	
	9.00	496	299	1,7	
	12.00	347	344	3,0	
	15.00	470	404	3,3	
	18.00	393	350	2,2	
	21.00	549	450	2,8	
	24.00	480	379	2,5	
4	3.00	509	484	2,2	
	6.00	379	430	2,8	
	9.00	419	482	3,3	
	12.00	475	564	3,3	
	15.00	352	377	3,4	
	18.00	312	400	6,1	
	21.00	407	408	4,5	
	24.00	693	506	8,1	
5	3.00	406	569	4,7	
	6.00	328	412	9,5	
	9.00	355	435	12,0	
	15	392	340	10,3	
	30	421	400	18,6	
	45	341	373	7,1	
	10.00	398	404	6,5	
	15	422	288	4,9	
	30	480	341	7,1	
	45	436	329	9,3	

Tab. 27 (7) : Kalbin "Rolfi" - $PGF_{2\alpha}$,PGFM,Progesteron,LH

Zyklustag Uhrzeit	$PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	PGFM fMol/ml	Progesteron ng/ml	LH ng/ml
5 11.00	359	409	4,9	
15	446	341	4,9	
30	414	397	6,0	
45	331	444	4,3	
12.00	286	390	4,9	
15	314	444	8,2	
30	284	365	8,2	
45	275	437	5,4	
13.00	268	405	4,3	
15	277	381	5,4	
30	248	418	6,0	
45	279	362	6,0	
14.00	242	375	4,9	
15.00	341	313	13,3	
18.00	227	241	13,4	
21.00	263	318	13,9	
24.00	557	355	21,8	
6 3.00	494	338	8,4	
6.00	346	355	8,9	
9.00	574	302	20,6	
12.00	368	332	16,2	
15.00	420	247	14,8	
18.00	520	339	25,7	
21.00	510	366	18,4	
24.00	602	405	12,3	
7 3.00	487	372	12,8	
6.00	485	369	18,9	
9.00	319	328	30,1	
12.00	393	347	8,9	
15.00	462	237	23,5	
18.00	397	308	12,3	
21.00	341	313	8.9	
24.00	333	338	21,8	
8 3.00	535	361	19,5	
6.00	708	315	22,4	
9.00	201	250	28,9	
15	135	225	13,4	
30	218	192	7,5	
45	289	186	13,4	
10.00	146	207	7,5	
15	195	254	10,7	
30	339	205	8,6	
45	336	234	10,7	
11.00	243	254	13,4	
15	219	265	9,1	
30	291	229	7,0	
45	326	259	8,6	
12.00	171	228	10,7	
15	174	190	8,0	
30	192	217	4,9	
45	223	236	20,3	
13.00	180	228	19,8	
15	193	205	8,1	
30	191	209	21,4	
45	136	177	12,3	
14.00	193	189	10,7	

Tab. 28 : Kalbin "Resana",3-stündige Blutentnahme $PGF_{2\alpha}$,Ocytocin,Progesteron an den Zyklustagen 13-17

Zyklustag	Uhrzeit	$PGF_{2\alpha}$ fMol/ml	Ocytocin pg/ml	Progesteron ng/ml
	0	218	21,4	45
13	3	629	51,0	540
	6	309	21,3	45
	9	286	49,2	163
	12	473	54,1	430
	15	530	74,1	1025
	18	692	38,7	619
	21	270	16,2	45
	0	1236	91,9	896
14	3	430	114,5	993
	6	563	82,4	928
	9	284	52,4	308
	12	295	21,3	314
	15	697	40,0	566
	18	330	23,4	75
	21	635	66,6	886
	0	317	24,7	140
15	3	292	22,5	38
	6	239	18,5	38
	9	334	23,3	159
	12	194	60,0	280
	15	627	81,2	824
	18	336	24,2	40
	21	384	45,0	343
	0	332	15,9	58
16	3	477	101,3	1228
	6	354	55,1	530
	9	218	8,5	113
	12	752	52,0	257
	15	357	15,1	252
	18	294	17,5	20
	21	17007	120,0	195
	0	335	28,2	30

Tab. 29 (1) : Ocytocininjektionen bei Kalbinnen ($PGF_{2\alpha}$,PGFM)

Zeit in Minuten	"Arche" $PGF_{2\alpha}$ fMol/ml		"Lunte" PGFM fMol/ml			$PGF_{2\alpha}$
	Tag 6	Tag 16	Tag 6	Tag 13	Tag 17	Tag 17
0	-	260	281	289	277	233
10	167	367	259	275	108	186
20	152	167	234	357	156	80
30	161	376	221	266	119	91
40	184	374	243	261	-	128
50	212	347	239	324	135	188
60	121	338	187	307	154	179
70	226	267	185	365	117	204
80	167	-	191	324	145	176
90	220	325	223	292	93	164
100	193	303	169	333	145	215
110	200	227	205	520	188	264
Injektion : 1 I.E. Ocytocin						
112	145	229	220	420	213	268
114	177	409	275	427	-	-
116	200	579	-	386	291	257
118	220	249	208	367	224	106
120	127	287	263	357	244	151
125	190	409	280	361	391	227
130	184	259	227	303	592	538
135	180	227	230	364	581	455
140	179	309	287	351	686	357
150	160	266	246	450	1281	940
160	167	277	222	437	885	478
170	210	216	191	680	1490	840
180	235	380	190	500	1625	1041
190	223	258	189	465	960	263
200	159	280	184	360	3004	3693
210	205	250	219	267	1292	953
220	209	160	198	389	707	305
230	200	315	200	375	1114	713
Injektion : 1 I.E. Ocytocin						
232	227	422	280	472	902	522
234	206	862	249	689	1531	1364
236	202	528	271	623	647	307
238	188	416	181	474	1019	491
240	192	470	214	353	860	379
245	205	610	240	455	925	288
250	158	-	206	417	868	608
255	262	-	228	418	1045	432
260	196	325	230	395	-	884
270	169	226	210	372	611	176
280	254	281	254	336	444	241

Tab. 29 (2) : Ocytocininjektionen bei Kalbinnen ($PGF_{2\alpha}$,PGFM)

Zeit in Minuten	"Arche" $PGF_{2\alpha}$ fMol/ml		"Lunte" PGFM fMol/ml			$PGF_{2\alpha}$
	Tag 6	Tag 16	Tag 6	Tag 13	Tag 17	Tag 17
290	178	302	261	372	235	282
Injektion : 1 I.E. Ocytocin						
292	243	461	250	538	215	250
294	217	705	249	561	299	330
296	247	373	259	471	452	367
298	174	422	242	433	239	132
300	217	433	275	431	242	80
305	206	314	218	513	141	193
310	213	447	256	415	217	226
315	202	307	241	428	233	179
320	199	250	244	340	175	173
330	213	228	261	471	199	176
340	215	305	273	465	157	80
350	227	277	194	409	155	80

Herrn Professor Dr. Heinrich Karg möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas,sowie für die guten Arbeitsmöglichkeiten in dem von ihm geleiteten Institut meinen Dank sagen.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. Heinrich H.D. Meyer für seine Geduld,die Betreuung,Ratschläge und seine immerwährende Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre zahlreichen kleinen Hilfestellungen. Besonders hervorheben möchte ich die gute Zusammenarbeit mit Frl. Brigitte Ziegltrum,ohne deren Einsatz die Auswertung der Versuche unmöglich gewesen wäre.
Auch der freundschaftliche Teamgeist der engeren Mitarbeiter Frl. Andrea Leitsch,Hr. Martin Rapp und Hr. H. Feck sei hier besonders erwähnt.

Herrn Dr. E.Schallenberger möchte ich für die Durchführung der Operationen am "Veitshof" danken,ebenfalls für ihre Einsatzfreude allen Mitarbeitern bei der Durchführung der Tierexperimente,insbesondere Herrn S.Prokopp.

Lebenslauf

Enzenhöfer Gerhard	geb. 18.04.1957 in Eysölden als dritter Sohn des Landwirtehepaares Adam Enzenhöfer und seiner Ehefrau Maria,geb. Schermeyer
Schulbildung	1963 - 1967 Volksschule in Eysölden 1967 - 1976 Neusprachliches Gymnasium in Hilpoltstein Reifeprüfung am 25.06.1976
Wehrdienst	1976 - 1977 15 Monate,in Pfreimd und Neunburg vorm Wald
Heirat	11.12.1981 Ehefrau Marianne,geb. Katheder,Sohn Michael Enzenhöfer geb. 25.04.1982
Universitätsstudium	1977 - 1983 10 Semester Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians Universität in München
Staatsexamen	13.01.1983
Approbation	22.02.1983

Seit 09.02.1983 arbeitete ich am Institut für Physiologie der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Weihenstephan,zunächst als Volontär, ab 01.05.83 bis 30.04.84 als wissenschaftliche Hilfskraft.